

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

**Effets du stress sur la physiologie immunitaire chez la perche commune, *Perca  
fulviatilis*  
modulation selon le niveau de domestication**

LAMBERT, Sophie

*Award date:*  
2009

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Université catholique de Louvain

Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix

Départements de biologie

---



Effets du stress sur la physiologie immunitaire chez la perche commune, *Perca fluviatilis*; modulation selon le niveau de domestication

Lambert Sophie

Mémoire présenté en vue de l'obtention  
du Master en biologie des organismes et écologie

Promoteur: Patrick Kestemont (FUNDP)

2008-2009

**Effets du stress sur la physiologie immunitaire chez la perche commune, *Perca fluviatilis*; modulation selon le niveau de domestication**

LAMBERT Sophie

**Résumé**

L'objectif de ce mémoire était, premièrement, de caractériser les effets physiologiques et immunologiques d'un stress de manipulation, ensuite de vérifier si les effets du stress passent par le cortisol et le récepteur glucocorticoïde, et enfin de déterminer si la domestication module cette réponse.

Les paramètres physiologiques (cortisol, glucose, osmolarité) et immunitaires (immunoglobulines, lysozymes, complément, production d'anions superoxydes) de la perche, *Perca fluviatilis*, ont été étudiés suite à des stress selon deux niveaux de domestication, F1 et F4. Nous avons appliqué deux types de stress aigu de manipulation, un unique et un répété. Une culture splénique avec des traitements de cortisol est venue compléter les tests. Le stress répété a induit peu de variations de des paramètres physiologiques, avec une augmentation du glucose mais pas du cortisol. Les paramètres de l'immunité ont été très peu influencés par ce même stress. La seconde expérience de stress unique a induit une hausse similaire pour le cortisol puis le glucose. Elle s'est déroulée respectivement après 1 et 6h. Ces paramètres sont revenus ensuite à la normale dans les 24h. L'osmolarité, quant à elle, n'a pas varié. Le stress unique a engendré également une augmentation des Ig et une diminution de l'activité du lysozyme, tout deux dans la rate mais pas dans le plasma. Ces variations de l'immunité n'ont pas permis de trancher entre un caractère néfaste ou bénéfique du stress. De plus, la culture *in vitro* nous apprend que le stress n'a pas agi sur ces 2 paramètres immunitaires via le cortisol. Cependant, un traitement avec ce stéroïde a provoqué une augmentation des transcrits des récepteurs glucocorticoïdes (GR), ce qui suggère une autorégulation du GR par son propre ligand. Enfin, la domestication n'a quant à elle pas induit d'effets sur l'immunité. En revanche, le cortisol et son récepteur ont présentés une diminution de leurs valeurs pour la génération F4 suite au stress.

En conclusion, des effets du stress sont visibles sur la physiologie et l'immunité, essentiellement suite au stress unique, mais ne sont pas imputables au cortisol. De plus, la domestication ne se répercute pas sur l'immunité en cas de stress.

## Remerciements

J'aimerais remercier tout d'abord Sylvain pour m'avoir poussé à faire du bon boulot et surtout pour le partage des informations et sa patience infinie pour les corrections et explications. Avec Neil, le duo de choc pour résoudre à toutes les énigmes. Merci aussi à Jessica, qui m'a confié ses échantillons malgré qu'elle ait chouchouté pendant de nombreux jours ces petits poissons pas si peureux. Un tout grand merci aussi à tous ceux qui ont participé aux prises de sang et au massacre de ces pauvres perches (je ne commence pas à faire l'énumération j'aurais trop peur de froisser quelqu'un en l'oubliant). Je remercie aussi Marie-Claire et Amélie, nos lanternes dans le sombre labyrinthe du laboratoire. Merci aussi aux survivantes de Namur, Nathalie et Sophie, pouvoir râler ensemble sur le monde entier ça soulage les nerfs (on s'en sortira les filles). Et enfin, je remercie tous ceux qui m'ont apporté leur soutien, quelques personnes déjà citées et essentiellement mon ange qui veille sur moi pour me faire décompresser et relativiser, pour m'aider à trancher et pour relire le bon ordre de mes mots.

## **Table des matières**

<b><u>Résumé .....</u></b>	<b><u>2</u></b>
<b><u>Remerciements .....</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b><u>I. Synthèse bibliographique .....</u></b>	<b><u>6</u></b>
1. <b><u>LES DIFFERENTS STRESS RENCONTRES EN AQUACULTURE</u></b> .....	7
2. <b><u>MECANISMES DE REPONSE AU STRESS</u></b> .....	8
2.1. Lieu de synthèse des hormones du stress .....	8
2.2. Organes cibles du stress.....	11
2.2.1. Cibles et inductions des catécholamines.....	11
2.2.2. Cibles et inductions du cortisol .....	12
2.3. Mécanismes d'action des récepteurs au cortisol.....	13
2.3.1. Les récepteurs impliqués .....	13
2.3.2. Voie de transduction du cortisol.....	15
2.4. Conséquences physiologiques d'un stress .....	17
3. <b><u>INFLUENCE DU CORTISOL SUR LES MECANISMES DE L'IMMUNITE</u></b> .....	18
3.1. Rappel des mécanismes immunitaires chez les poissons.....	18
3.2. Mise en place des mécanismes non-spécifiques après un stress et une régulation du cortisol .....	20
3.3. Mise en place des mécanismes spécifiques après un stress et une régulation du cortisol .....	22
4. <b><u>MODULATION DES REPONSES AU STRESS EN FONCTION DE LA DOMESTICATION</u></b> .....	23
4.1. Effets de la domestication sur la réponse au cortisol.....	24
4.2. Base génétique .....	25
<b><u>II. Introduction, contexte et objectifs du mémoire.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>III. Matériels et méthodes .....</u></b>	<b><u>30</u></b>
EXPÉRIENCE 1 : EFFET DU STRESS AIGU RÉPÉTÉ.....	32
A. Protocole expérimental .....	32
B. Prélèvement du matériel biologique.....	32
C. Méthodes d'analyse.....	33
1. Dosage du glucose .....	33
2. Dosage du cortisol.....	33
3. Quantité relative d'ARNm des récepteurs Glucocorticoïdes.....	35
4. Dosage des Immunoglobulines .....	38
5. Dosage du lysozyme .....	38
D. Analyse statistique.....	40
EXPÉRIENCE 2 : EFFET DU STRESS AIGU UNIQUE .....	40
A. Protocole expérimental .....	40
B. Méthodes d'analyse.....	41
1. Osmolarité à point de congélation.....	41
2. Dosage de l'activité du complément .....	41
3. Dosage des radicaux libres .....	42
C. Analyse statistique.....	43
EXPÉRIENCE 3 : EFFET DU CORTISOL SUR DES CULTURES TISSULAIRES DE RATES .....	43
1. Protocole expérimental .....	43
2. Prélèvement du matériel biologique.....	44
3. Méthodes d'analyse.....	44
4. Analyse statistique.....	44

<b><u>IV. Résultats .....</u></b>	<b><u>45</u></b>
EXPÉRIENCE 1 : EFFET DU STRESS AIGU RÉPÉTÉ .....	47
1. Dosage du glucose .....	47
2. Dosage du cortisol .....	47
3. Dosage des Immunoglobulines.....	49
4. Dosage de l'activité des lysozymes .....	49
5. Quantité relative d'ARNm des récepteurs Glucocorticoïdes.....	49
EXPÉRIENCE 2 : EFFET DU STRESS AIGU UNIQUE .....	51
1. Dosage du glucose .....	51
2. Dosage du cortisol .....	51
3. Dosage de l'osmolarité .....	51
4. Dosage des Immunoglobulines.....	53
5. Dosage des lysozymes .....	53
6. Dosage de l'activité du complément .....	53
7. Dosage de la production de radicaux libres .....	53
8. Dosage des ARNm des glucocorticoïdes dans la rate .....	55
EXPÉRIENCE 3 : EFFET DU CORTISOL SUR DES CULTURES TISSULAIRES DE RATES .....	55
1. Dosage des Immunoglobulines.....	55
2. Dosage de l'activité des lysozymes et de la production de radicaux libres .....	55
3. Dosage des ARNm des glucocorticoïdes .....	55
<b><u>V. Discussion .....</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b><u>VI. Conclusion et perspectives.....</u></b>	<b><u>66</u></b>
<b><u>VII. Annexes.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
1. LEXIQUE DES ABREVIATIONS .....	70
2. ANNEXES STATISTIQUES .....	71
Expérience 1 : Effet du stress aigu répété .....	71
Expérience 2 : Effet du stress aigu unique .....	72
Expérience 3 : Effet du cortisol sur des cultures tissulaires de rates.....	75
<b><u>VIII. Références bibliographiques.....</u></b>	<b><u>77</u></b>

## **I. Synthèse bibliographique**

## **1. Les différents stress rencontrés en aquaculture**

Le concept de stress a été défini par Brett comme « Un état produit par un facteur environnemental ou autre qui étend l'adaptation de l'animal au-delà de la norme ou qui dérègle le fonctionnement normal, à tel point que, dans certains cas, les chances de survie sont nettement réduites ». L'impact d'un stress est fonction de la sévérité et de la durée de ce stress et semble cumulatif en présence de plusieurs agents stressants. La réponse varie selon l'espèce de poissons, le stade de développement et le taux de domestication (Iwama *et al.*, 1997). Les poissons peuvent être stressés par différents paramètres aussi bien dans leur milieu naturel qu'en conditions d'élevage. Mais, certains de ces stress sont différents dans l'importance de leur proportion relative. Ainsi, dans les rivières ou les lacs, les poissons sont soumis à la prédation et souvent à la compétition pour l'alimentation et la reproduction. Ces phénomènes sont autant de situations stressantes. Par contre, en pisciculture ces contraintes existent peu. En outre, la nourriture est fournie en suffisance pour assurer une croissance optimale et pour limiter la compétition intra-spécifique.

L'élevage, quant à lui, engendre des stress de manipulations, de confinement, de transport, de densité et de perturbations des interactions entre individus. La manipulation des poissons intervient lors du transfert en bassins plus adaptés à la taille et à l'âge des poissons, pour permettre un entretien des bacs (Iwama *et al.*, 1997) ainsi que lors de traitement de maladies (Wedemeyer, 1996). Le transport des poissons est également repris dans les stressseurs. En effet, on veille à transporter le moins d'eau possible pour un grand nombre de poissons par soucis économiques. Dans ce cas, un oxygénateur permet de combler la consommation d'oxygène excessive due au stress. De plus, la concentration en urine dans l'eau de transport est susceptible d'induire des mortalités chez les poissons transportés (Wedemeyer, 1996). Une densité trop élevée engendre donc une forte consommation de l'oxygène et une augmentation des déchets métaboliques (ammonium, dioxyde de carbone,...) dont la concentration dans l'eau peut augmenter rapidement. L'eau de transport engendre alors un grand choc à l'arrivée dans une eau totalement différente du point de vue de la composition physico-chimique et essentiellement en gaz dissous. Cependant, le seuil de densité toléré est fonction de l'espèce. Par exemple, la perche (*Perca fluviatilis*) qui est une espèce grégaire tolère, dans une certaine mesure, une forte densité avec une croissance optimale à 80 à 100 kg/m<sup>3</sup> (80 -100 g/L) (Dick *et al.*, 2003). Chez les salmonidés par contre, la promiscuité des dominants et des subordonnés



peut engendrer un stress chronique chez ces derniers qui seront plus sensibles aux maladies et auront une croissance moindre (Iwama *et al.*, 1997).

En plus des stress propres aux deux environnements, artificiel et naturel, on peut également rencontrer des stress communs. Ceux-ci sont principalement liés à la qualité physico-chimique de l'eau et à la présence de pathogènes. La qualité de l'eau est définie selon plusieurs facteurs comme les composants chimiques, le pH, la dureté, la température, la turbidité, les polluants (Wendelaar Bonga, 1997) et les gaz dissous, ainsi que leurs interactions. L'oxygène est un paramètre essentiel à surveiller car il possède un coefficient de diffusion entre l'air et l'eau assez bas.

## **2. Mécanismes de réponse au stress**

Comme tous les animaux, les poissons peuvent survivre à des conditions défavorables durant des périodes limitées en activant des mécanismes de compensation physiologique.

### **2.1. *Lieu de synthèse des hormones du stress***

Comme de nombreux système de communication avec le monde environnant, l'organisme utilise ses systèmes nerveux et endocrinien pour agir contre l'influence du stress. Le haut degré de conservation des mécanismes de réponses au stress à travers l'évolution dénote le caractère primordial de ces systèmes. La réponse est initiée par le système limbique. Par la suite, deux composantes majeures neuroendocrines sont impliquées.

La première manifestation de la réponse, rapide, concerne le système nerveux sympathique et plus précisément les fibres post-ganglioniques cholinergiques qui vont assurer la libération des catécholamines. Celles-ci sont produites par les cellules chromaffines de l'interrénale (équivalent de la glande surrénale des mammifères) à partir de la tyrosine. Les catécholamines sont ensuite relarguées dans le sang par une libération de vésicules calcium dépendante (Eckert, 1999 ; Calvino, 2003). En plus de cela, le système nerveux sympathique freine aussi la dégradation de l'adrénaline pour en augmenter la concentration dans le cœur dans les quelques heures suivant un stress aigu. Chez les poissons téléostéens, la principale catécholamine est l'adrénaline et en seconde position la noradrénaline (Wendelaar Bonga, 1997).

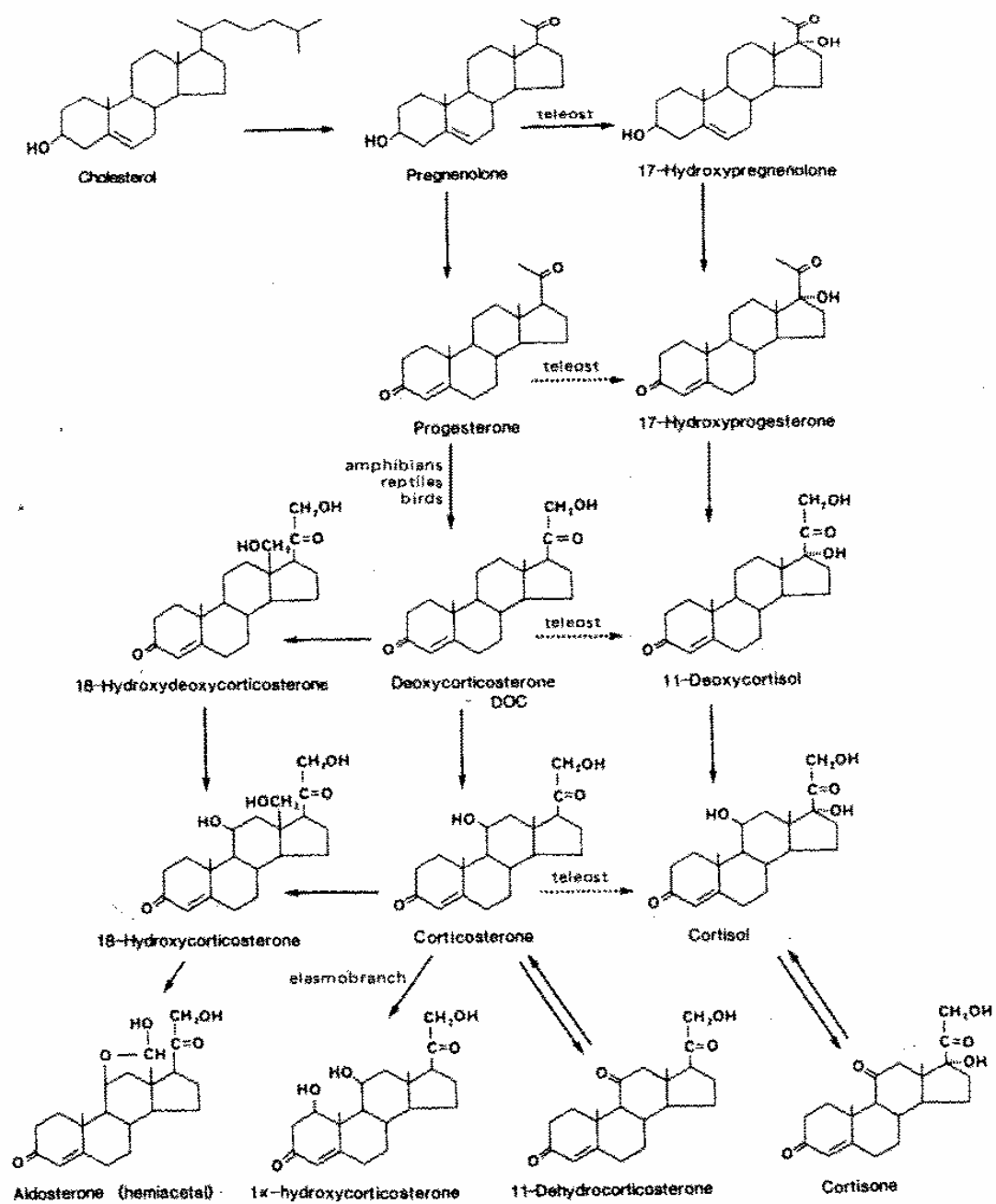


Figure 1 : Voie de biosynthèse des corticostéroïdes (Henderson et Kime, 1991)

Cette première activation adrénergique est couplée à une seconde plus lente mais également provoquée par le stress. Cette voie augmente le taux de sérotonine dans le cerveau et active l'axe HPI (Hypothalamus-Pituitary-Interrenal). L'interrénale des téléostéens est l'homologue de la corticosurrénale des mammifères (Branson, 2008 ; Flik *et al.*, 2006). Suite à un stress, l'hypothalamus contrôle la libération d'hormones produites par l'hypophyse. Cela se fait via la production de corticotropin-releasing-factor (CRF) et d'urotensine (UI) (Bernier *et al.*, 2001 ; Flik *et al.*, 2006 ; Hosoya *et al.*, 2007 ; Doyon *et al.*, 2006 ; Weyts *et al.*, 1999). Les axones du noyau hypothalamique preoptique (NPO) qui produisent le CRF s'insèrent sur la glande pituitaire. Le CRF des poissons a comme particularité de ne pas être libre dans le sang circulant contrairement à celui des vertébrés supérieurs. Cette hormone se transmet via les synapses ou via la vascularisation du lobe postérieur de l'hypophyse (Flik *et al.*, 2006). Selon ce contrôle, les principales sécrétions hypophysaires, l'Adreno CorticoTropic Hormone (ACTH) et les  $\alpha$ -MSH/ $\beta$ endorphines, sont émises. Le signal primaire de l'ACTH conduit à la synthèse et la libération dans le sang de corticostéroïdes et principalement du cortisol chez les poissons (Branson, 2008 ; Calvino, 2003 ; Gilles, 2006, Hagen *et al.*, 2006). Les téléostéens montrent une faible production de corticostérone, cortisone, aldostérone et autres stéroïdes 18-oxygénés. (Henderson et Kime, 1991; Harris *et al.*, 2000 ; Bury *et al.*, 2007). Le cortisol, qui est donc la principale hormone du stress, est synthétisé à partir du cholestérol (voir figure 1), mais pas strictement de la même manière que chez les mammifères. En effet, après la traditionnelle conversion du cholestérol en prégnénolone, 17- hydroxyprégnénolone, 17- hydroxyprogéstérone et 11-déoxycortisol, il y a d'abord hydroxylation des carbones 11 et 21 avant le 17 qui permet la conversion du corticostérone en cortisol. Cela se fait de préférence sur les molécules de 17- hydroxyprogéstérone et de 11-déoxycortisol plutôt que le corticostérone et la cortisone (Henderson et Kime, 1991 ; Prunet *et al.*, 2006).

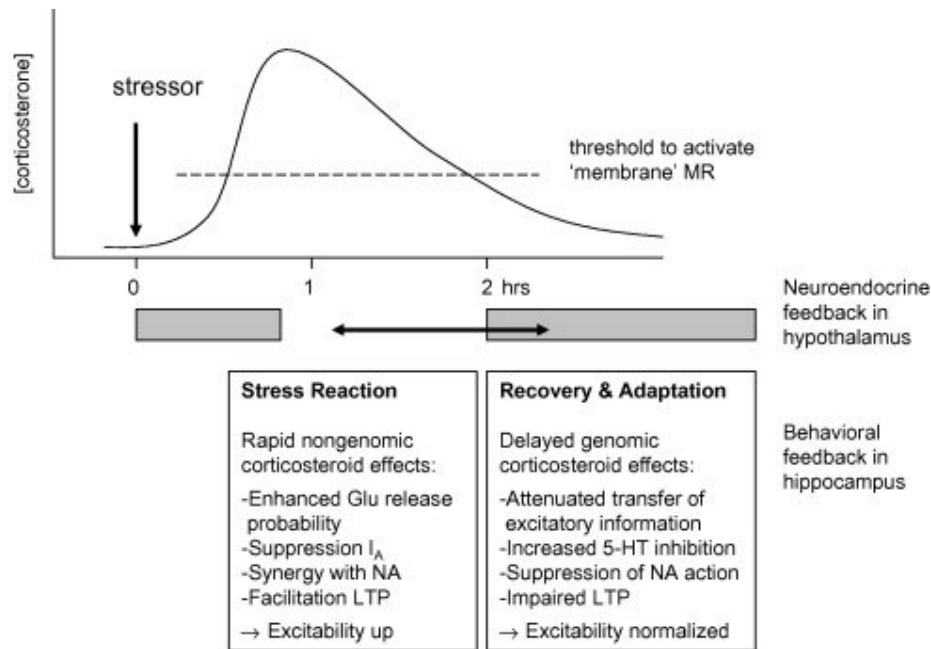


Figure 2 : Exemple de feed-back négatif sur l'hypothalamus par la corticostérone (Kloet *et al.*, 2008)

Il est intéressant de noter qu'il existe des mécanismes pour limiter les effets délétères du cortisol dû à un stress prolongé. Il existe une rétroaction négative sur la production d'une part, d'ACTH par l'hypothalamus et d'autre part, de CRF et UI par l'hypophyse (Wendelaar Bonga, 1997 ; Bernier *et al.*, 2001 ; Trenzado *et al.*, 2003 ; Doyon *et al.*, 2006). Des autres feedbacks négatifs peuvent se produire par la désensibilisation de l'intermédiaire aux stimulations de l'ACTH, par l'augmentation du taux de dégradation du cortisol ou encore par la diminution du nombre et/ou de l'affinité des récepteurs au cortisol (Trenzado *et al.*, 2003 ; Iwama *et al.*, 1997, Takahashi *et al.*, 2006 ; De Bosscher *et al.*, 2008) (voir figure 2).

## 2.2. Organes cibles du stress

Les hormones produites lors du stress vont provoquer une série de réponses en se fixant sur leur cible afin d'activer les mécanismes de défense.

### 2.2.1. Cibles et inductions des catécholamines

L'adrénaline se fixe à des récepteurs  $\beta$  dépendant qui provoquent l'augmentation des échanges  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Wedemeyer, 1996 ; Wendelaar Bonga, 1997) et inhibent

l'échangeur d'anions  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  au travers de la membrane plasmique des érythrocytes. Cela va provoquer l'acidification du plasma et l'alcalinisation du cytoplasme des globules rouges. Cette augmentation de pH accroît l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène dans les 5 minutes qui suivent le stress. Ce phénomène est propre aux téléostéens et reste très variable d'une espèce à l'autre. Le transport d'oxygène est donc plus efficace grâce à l'adrénaline. Un autre système permet d'accroître encore davantage l'efficacité de la respiration. Les catécholamines allant dans la rate provoquent l'augmentation du nombre de globules rouges circulants. Les divisions amitotiques des érythrocytes sont médiées par la liaison de l'adrénaline sur les  $\alpha$  adrénorécepteurs et leur libération se fait par contraction de la rate également provoquée par l'action des catécholamines. L'action des catécholamines sur la respiration est complétée par leurs effets sur le rythme cardio-respiratoire (Wendelaar Bonga, 1997). Cela permet à l'animal d'acquérir une capacité respiratoire plus élevée et une quantité de sang plus importante en direction des branchies. Les catécholamines ont également un rôle dans le métabolisme énergétique. La mobilisation des substrats énergétiques est influencée par l'adrénaline qui, en se fixant sur ses  $\beta_2$  récepteurs, favorise la glycogénolyse à partir du glycogène du foie. La gluconéogenèse est également stimulée par les catécholamines dans une moindre mesure. Le taux élevé de catécholamines durant un stress chronique peut mener à la désensibilisation de la cible par diminution de la régulation des  $\beta$  adrénorécepteurs (Wendelaar Bonga, 1997).

#### 2.2.2. Cibles et inductions du cortisol

Le cortisol, fortement régulé après un stress, a des effets ubiquitaires chez le poisson. Si le stress persiste au niveau de la demande en énergie, le cortisol va intervenir pour soutenir la production de sucre. Il favorise la mobilisation du glucose par recrutement du glycogène. Le sucre est dégradé préférentiellement suite à l'augmentation de la glycogène phosphatase et à la diminution de la glycogène synthétase (Trenzado *et al.*, 2003). Dans un second, le cortisol induit la gluconéogenèse. Celle-ci utilise des protéines pour fournir de l'énergie via l'augmentation de l'activité de l'aminotransférase hépatique et de la

phosphoénolpyruvate carboxykinase (Jentoft *et al.*, 2005 ; Trenzado *et al.*, 2003 ; Vijayan *et al.*, 2003 ; Iwama *et al.*, 1997). La gluconéogenèse utilise aussi les lipides et donc provoque l'augmentation du taux d'acides gras dans le sang (Iwama *et al.*, 1997). Le stress provoque également une diminution du sucre alloué à la périphérie et la modification de l'action des autres hormones glycériques au profit des organes les plus importants comme le cœur, le cerveau, les poumons, le foie et les muscles (Acerete *et al.*, 2007 ; Iwama *et al.*, 1997 ; De Bosscher *et al.*, 2008).

Le cortisol est également connu pour avoir des effets négatifs sur les organes secondaires qui n'interviennent pas dans la défense (Gilles, 2006 ; Eckert, 1999 ; Iwama *et al.*, 1997). Parmi ces effets délétères, il y a épuisement du glycogène du foie, diminution du poids de la rate, atrophie de la muqueuse gastrique et changement histologique des branchies. Spécialement en stress chronique, l'interrénale s'hypertrophie et fini par subir une dégénération cellulaire qui est irréversible avec perte de fonction. (Wedemeyer, 1996).

rtMR	A/B	C	D	E
	31%	93%	31%	72%
hMR	A/B	C	D	E
	10%	92%	22%	50%
rtGR1	A/B	C	D	E
	7%	90%	25%	56%
rtGR2	A/B	C	D	E

Figure 3: Comparaison des séquences d'acides aminés pour les domaines A/B, C, D et E entre les minéralocorticoïdes de truite (rtMR), les glucocorticoïdes de truite (rtMR) et les minéralocorticoïdes de l'homme (hMR) (Prunet *et al.*, 2006).

## 2.3. Mécanismes d'action des récepteurs au cortisol

### 2.3.1. Les récepteurs impliqués

Les effets des hormones corticostéroïdes sont contrôlés par des récepteurs intracellulaires qui agissent comme des facteurs de transcription dépendants du ligand. Parmi ces récepteurs, il faut distinguer les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) des

récepteurs minéralocorticoïdes (MR). Le cortisol est un ligand à haute affinité pour ces récepteurs (Scherrer *et al.*, 1990 ; De Bosscher *et al.*, 2008 ; Terova *et al.*, 2005). Chez l'homme, on considère que le cortisol agit sur les récepteurs glucocorticoïdes mais qu'il n'agit peu ou pas sur les récepteurs minéralocorticoïdes qui ont une affinité plus importante pour deux autres hormones stéroïdes : la 11-déoxycorticostérone et l'aldostérone. Cependant il n'y a pas de production significative d'hormones minéralocorticoïdes chez les poissons téléostéens en dehors de la période de reproduction (Colombe *et al.*, 2000 ; Milla *et al.*, 2008). L'aldostérone et le cortisol sont tous les deux actifs sur les MR avec une plus rapide dissociation dans le cas du cortisol. Or, l'activation du MR requière une plus faible quantité de cortisol ( $ED_{50}$  entre  $10^{-10}$  et  $10^{-9}$  nM ou  $EC_{50}$  0,02 nM) que les GR ( $EC_{50}$  2-5 nM) (Stolte *et al.*, 2006 ; Colombe *et al.*, 2000 ; Greenwood *et al.*, 2003). La nature du récepteur au cortisol n'est donc pas entièrement déterminée chez les poissons. Ces récepteurs corticostéroïdes présentent une haute conservation avec une même structure : un domaine N-terminal A/B responsable de la transactivation de gènes cibles (Stolte *et al.*, 2006), un domaine C responsable de la liaison avec l'ADN (GRE) et la dimérisation du récepteur, un domaine D impliqué dans le changement de conformation, et un domaine E du côté C-terminal qui est le site de liaison de l'hormone. Le domaine A/B est très variable en taille et en composition entre les espèces alors que les domaines C et E sont les plus fortement conservés (voir figure 3). Deux isoformes de GR ont été décrites par Greenwood chez *Haplochromis burtoni*. Elles présentent une variation au niveau du domaine A/B et possèdent deux différents gènes codants. Ces deux formes sont appelées GR1 et GR2. Elles ont été rencontrées par la suite dans les autres espèces étudiées comme la truite (Bury *et al.*, 2003) et dans divers tissus comme la surrénale, la rate, les branchies, l'intestin, le cœur et le foie (Vazzana *et al.*, 2007). La présence du duplicat des gènes du GR est le résultat de la duplication du génome entier qui s'est produit dans l'évolution avant la radiation des poissons téléostéens et après la divergence des tétrapodes. La date estimée de cet évènement serait au alentour de 300 millions d'années. Cependant tous les téléostéens n'ont pas obligatoirement la présence effective du duplicat de gènes des GR ; il peut avoir une perte secondaire d'une copie due à une mutation (Stolte *et al.*, 2006). Chez la perche, il ne semble pas y avoir deux isoformes (Milla *et al.*, données non publiées). En résumé, les sites d'action du cortisol sont multiples. Il agit sur les deux classes de récepteurs de la famille des

corticorécepteurs qui sont les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Ces derniers sont aux nombres de 2 suite à une duplication du génome soit GR1 et GR2. Les paramètres qui définissent la sensibilité au cortisol sont le nombre de récepteurs ainsi que l'affinité et la spécificité du récepteur (Bamberger, 1996). L'affinité des récepteurs pour le cortisol et l'ADN détermine aussi la fonction propre à chaque type de récepteur (Prunet *et al.*, 2006).

### 2.3.2. Voie de transduction du cortisol

La voie de signalisation du cortisol permet in fine la transcription de gènes cibles via une interaction avec son récepteur qui agit donc en tant que facteur de transcription ligand-dépendant. En regardant plus en détail le mécanisme, le cortisol libre traverse la membrane cellulaire par diffusion passive pour se lier sur son récepteur (glucocorticoïde ou minéralocorticoïde). Ce récepteur doit au préalable changer de conformation pour accueillir le ligand sur une poche hydrophobe au niveau du domaine E. Deux protéines chaperonnes sont nécessaire à ce changement de conformation. Ainsi l'Heat Shock Protein 70 (HSP) initialise, via un processus ATP-dépendant, l'ouverture du domaine de liaison. Ensuite une autre protéine chaperonne, l'HSP 90, vient se fixer au complexe HSP 70/GR pour permettre la configuration active. Le cortisol peut alors se fixer dans l'emplacement qui lui est destiné avec une haute affinité. Suite à cette liaison, les chaperonnes se dissocient alors que le récepteur reste dans une forme stable. Par la suite, il va être transloqué par les importines au travers des pores nucléaires grâce à sa phosphorylation et à la reconnaissance du signal de localisation nucléaire (NLS) (Bury *et al.*, 2007). Dans le noyau, il s'homodimérise pour se placer face aux motifs d'ADN qu'il reconnaît spécifiquement, les Glucocorticoids-Responsive-Elements (GREs). Le cortisol permet ainsi une activation ou une inhibition de la transcription des gènes cibles (Beato *et al.*, 1995).



Tableau 1 :

Table 1. Changes in fish immune indicators after different husbandry stressors. Values are calculated as the reduction in percentage indicator compared to respective controls, which were set at 100%. PI Phagocytic index (Tort *et al.*, 2004)

<i>Stressor</i>	<i>Indicator</i>	<i>Change (%)</i>	<i>Species</i>	<i>Reference</i>
Transport	PI	93.2	<i>Ictalurus punctatus</i>	Ainsworth et al., 1991
Transport	Blood PI	83.2	<i>Ictalurus punctatus</i>	Ainsworth et al., 1991
Transport	Head of the kidney PI	44	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Narnaware et al., 1994
Transport	Lysozyme activity	57.6	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Möck and Peters, 1990
Transport	Spleen PI	61	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Narnaware et al., 1994
Transport	Mitogenesis	45.4	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Maule et al., 1989
Grading	Antibody-producing cells	19	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Maule et al., 1989
Chronic	Head of the kidney PI	87	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Narnaware et al., 1994
Chronic	Spleen PI	76	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Narnaware et al., 1994
Confinement	Bactericidal activity	37.5	<i>Salmo salar</i>	Thompson et al., 1993
Confinement	Respiratory burst	55.6	<i>Salmo salar</i>	Thompson et al., 1993
Confinement	Thymic mitosis	222.5	<i>Sparus aurata</i>	Cubero and Molinero, 199
Confinement	Lymphocytes	52.3	<i>Sparus aurata</i>	Cubero and Molinero, 199
Handling	Antibody-producing cells	24	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Maule et al., 1989
Handling	Thymus leukocytes	173	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Maule and Schreck., 1990
Handling	Serum hemolysis	70.1	<i>Sparus aurata</i>	Sunyer et al., 1995
Handling	Agglutination	79.5	<i>Sparus aurata</i>	Sunyer et al., 1995
Handling	Lysozyme activity	143.3	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Möck and Peters, 1990
Handling	Respiratory burst	85.7	<i>Sparus aurata</i>	Ortuño et al., 2003
Deficient diet	Agglutination	64.7	<i>Sparus aurata</i>	Tort et al., 1996
Deficient diet	Serum hemolysis	56.1	<i>Sparus aurata</i>	Montero et al., 1998
Deficient diet	Serum hemolysis	60.5	<i>Sparus aurata</i>	Montero et al., 2001
Deficient diet	Hemagglutination	89.3	<i>Sparus aurata</i>	Montero et al., 2001
Feeding alteration	Phagocytic index	89.7	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Alcorn et al., 2003
Crowding	Serum hemolysis	68.3	<i>Pagrus pagrus</i>	Rotllant et al., 1997
Crowding	Agglutination	79.6	<i>Pagrus pagrus</i>	Rotllant et al., 1997
Crowding	pfc/10 <sup>6</sup> lymphocytes	42.9	<i>Salmo salar</i>	Mazur and Iwama, 1993
Crowding	Serum hemolysis	88.8	<i>Sparus aurata</i>	Tort et al., 1996
Crowding+anesthetics	Complement	44.4	<i>Sparus aurata</i>	Ortuño et al., 2002
Crowding+anesthetics	Phagocytic activity	60.8	<i>Sparus aurata</i>	Ortuño et al., 2002
Chemical HgCl <sub>2</sub>	Apoptosis/necrosis	73.3	<i>Salvelinus namaycush</i>	Miller et al., 2002

Remarquons qu'au contraire des mammifères, les glucocorticoïdes des poissons provoquent une augmentation de la transcription des GR (Takahashi *et al.*, 2006, Vijayan *et al.*, 2003). Or, une hausse des transcrits du GR ne s'accompagne pas toujours d'une augmentation de la quantité de protéines (Vijayan *et al.*, 2003). Il y aurait donc chez les poissons un mécanisme de rétroaction négative du cortisol sur son récepteur tel que la dégradation des GR via le protéasome (Boone et Vijayan, 2002 ; Vijayan *et al.*, 2003 ; Sathiyaa et Vijayan, 2003).

#### *2.4. Conséquences physiologiques d'un stress*

Lors d'un transport ou d'un autre stress, une plus forte activité physique est provoquée. Par exemple, les poissons consomment deux fois plus d'oxygène lors de transport que dans leurs conditions de repos. Cela provoque une augmentation d'acide lactique dans le sang et donc une acidose de celui-ci (Branson, 2008). Le premier impact est une hypoxie des tissus car l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène diminue : c'est l'effet de Bohr (Wedemeyer, 1996). Ce phénomène peut éventuellement entraîner une narcose au CO<sub>2</sub> et même la mort.

Le second effet subit par l'hémoglobine est « l'effet de Root » lorsque la capacité maximale de liaison de l'oxygène est atteinte. De plus, la digestion favorise encore plus la consommation d'oxygène. Il faut donc éviter de nourrir les poissons avant un trajet (Wedemeyer, 1996). Pour contrer les problèmes d'oxygène, les catécholamines ont un rôle direct sur la respiration en augmentant la capacité de transport de l'oxygène par l'hémoglobine des érythrocytes et en favorisant la vasodilatation des branchies (Wedemeyer, 1996; Acerete *et al.*, 2004). Une autre protection se met en place pour éviter, quant à elle, l'augmentation spectaculaire de l'osmolarité du sang (Rouger *et al.*, 1998). Elle favorise l'excrétion des électrolytes en surplus via l'urine. Un stress a également de nombreux effets sur le métabolisme énergétique, lipidique, glucidique et protéique (Wendelaar Bonga, 1997) et également des effets à court terme (réponse secondaire) sur l'immunité que nous détaillerons par la suite.

La réponse au stress à la suite d'un évènement neuroendocrine a pour but de protéger ou de rétablir l'homéostasie (Branson, 2008 ; Flik *et al.*, 2006 ; Fast *et al.*, 2008 ; Calvino, 2003). Or, à long terme, lorsque l'organisme n'arrive plus à lutter contre le stress, on arrive à la phase d'épuisement due notamment à l'élévation constante des glucocorticoïdes (réponse tertiaire). Cela se marque sur tous les systèmes de l'organisme : la production d'énergie, la croissance, la

reproduction et le système immunitaire. Premièrement, la balance énergétique doit être favorisée par l'augmentation de la lipolyse qui provoque une hausse du cholestérol.

Lorsque les lipides s'épuisent se sont les protéines qui sont utilisées pour fournir de l'énergie ce qui provoque la réduction ou l'arrêt de la croissance (Jentoft *et al.*, 2005 ; Trenzado *et al.*, 2003). Ensuite, le stress affecte également le système reproducteur en altérant la taille des gonades, la production de stéroïdes sexuels et la fécondité. Par exemple, les Œufs issus de parents stressés sont plus petits et ont un plus faible taux de survie (Wang *et al.*, 2006). Enfin, le système immunitaire est fortement affaibli en cas de stress (voir tableau 1). Il y a donc augmentation de la gravité des lésions et des maladies dues aux bactéries, virus, champignons et ectoparasites (Iwama *et al.*, 1997).

### 3. Influence du cortisol sur les mécanismes de l'immunité

Comme nous l'avons vu précédemment, un stress induit de nombreux bouleversements physiologiques dont une hausse de cortisol plasmatique. Nous étudierons dans cette partie la relation entre cette régulation du cortisol et les effets observés sur l'immunité.

#### 3.1. *Rappel des mécanismes immunitaires chez les poissons*

La première ligne de défense est la barrière physique et chimique non spécifique au niveau de la peau et des entrées de l'organisme. Le mucus de la peau contient des mucopolysaccharides et des enzymes bactériolytiques qui attrapent, immobilisent et lysent les bactéries de toutes sortes, pathogènes ou non. Toutes les protéines reconnues comme non-soi vont entraîner une réponse du système immunitaire non-spécifique (Bols *et al.*, 2001; Köllner *et al.*, 2002). Les molécules impliquées sont les polysaccharides, lipopolysaccharide (LPS), les peptidoglycans, l'ADN bactérien et l'ARN double brin viral, ainsi que d'autres molécules présentes à la surface des pathogènes. Ils vont être pris en charge par la composante humorale qui comprend des inhibiteurs de croissance, diverses enzymes lytiques, des lectines de type C (Calcium dépendantes) et S (thiol dépendantes), et le système du complément (Magnadóttir, 2006 ; Alexander et Ingram, 1992). Chacun de ces acteurs agit d'une façon particulière. Les inhibiteurs consistent en des chélateurs qui vont priver les bactéries et les parasites de leurs ions inorganiques essentiels. On rencontre aussi des inhibiteurs de protéases comme les  $\alpha$ 2-macroglobulines qui empêchent l'action des protéases sécrétées par les pathogènes (Magnadóttir, 2006 ; Alexander et Ingram, 1992). Parmi les enzymes lytiques sont présente la

chitinase, les cathepsines, le système du complément et le lysozyme (Bols *et al.*, 2001). Ce dernier est présent dans le mucus, le sérum, les neutrophiles, les mononucléaires et les phagocytes et a pour rôle de lyser les parois bactériennes, de stimuler la production d'immunoglobulines, d'activer les macrophages, et accélérer la destruction des bactéries (Magnadóttir, 2006 ; Wedemeyer, 1996). Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques capables de s'auto-activer en chaîne suite au contact avec les éléments de la membrane bactérienne et vise à lyser cette membrane. Si les pathogènes passent la première barrière, à l'occasion d'une plaie ou par un autre moyen, ils provoquent une réponse inflammatoire non spécifique. Les macrophages tissulaires et les leucocytes circulants (neutrophiles) sont chimiquement attirés et phagocytent les bactéries intruses. A l'intérieur des macrophages, le phagosome contenant la bactérie fusionne avec un lysosome qui contient des cytotoxines dont l'interféron 1 (agent antiviral qui renforce le potentiel des cellules infectées et bloque la multiplication de l'ADN du virus (Roberts, 1979)) et des enzymes lytiques (Wedemeyer, 1996). Chez les vertébrés inférieurs, le système immunitaire non-spécifique est d'une importance majeure dans le rejet des parasites et la résistance aux maladies. Il est initié généralement dans les heures qui suivent la pénétration du parasite (6h pour le *Trypanoplasma borreli* infectant la carpe non immunodéficente). Cette réaction se manifeste par l'expression de la famille des interleukines-1 (IL-1). Celle-ci est une famille de cytokines pré-inflammatoire qui va ensuite réguler positivement ou négativement les autres cytokines (Engelsma *et al.*, 2002 ; Hässig *et al.*, 1996). Le facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) est la deuxième cytokine à apparaître après l'IL-1. Leur expression est par exemple due à la présence de lipopolysaccharides (LPS). Les phagocytes activés, recrutés au site d'inflammation, produisent des intermédiaires d'oxygène réactif et /ou de nitrogène réactif (ROI/RNI) qui visent à endommager l'ADN ou des groupes fonctionnels des organismes néfastes (Saeij *et al.*, 2003 ; Hässig *et al.*, 1996). La présence de substances pathogènes, de cytokines et de composés oxygénés est suivie par l'augmentation rapide d'ARNm des protéines de la phase aigue comme la C-réactive protéine et le sérum amyloïde A protéine. Il s'ensuivra l'inactivation des protéases, la neutralisation de molécules toxiques et des ions superoxydes, l'évacuation de débris membranaires, leucocytaires ou cellulaires et de débris nucléaires (Hässig *et al.*, 1996 ; Acerete *et al.*, 2007).

Si le pathogène est toujours actif à ce niveau, c'est le système spécifique qui entre en jeu. Les protéines et les carbohydrates des parois cellulaires des bactéries gram négatif et des enveloppes virales sont souvent antigéniques (Wedemeyer, 1996 ; Roberts, 1979 ; Yin *et al.*, 1995). Les enzymes facilitant la pénétration du pathogène et produites par celui-ci peuvent aussi être des antigènes solubles. Le poisson va alors répondre en produisant des anticorps. Ce sont des protéines du groupe des immunoglobulines (Ig). Chez les poissons, on reporte essentiellement une classe d'immunoglobulines semblables aux IgM des mammifères qui eux comptent 5 classes au total (Roberts, 1979). Des études plus récentes mettent à jour l'existence d'autres Ig en quantité moins élevée (Pilström et Bengtén, 1996 ; Whittington, 1993 ; Scapigliati *et al.*, 1999). Les anticorps vont se fixer sur ces antigènes et vont soit provoquer leur inactivation, soit faciliter leur absorption par des macrophages. Les pathogènes inactivés vont être présentés par les macrophages ou les neutrophiles au niveau de la rate et des reins des poissons. Ces antigènes inactifs serviront de modèles pour fabriquer des lymphocytes spécifiques. Il en existe deux sortes. Les premiers sont les lymphocytes T qui vont être activés par des cytokines telles que l'interleukine 2. Ce type de lymphocytes présentent plusieurs anticorps à leur surface ce qui permet de fixer plusieurs antigènes. Le complexe formé est ingéré par un seul macrophage et favorise une phagocytose plus efficace. Elle est également amplifiée par le système du complément qui permet en plus d'attirer d'autres cellules immunes (Roberts, 1979). Les seconds lymphocytes, appelés lymphocytes B, vont produire des anticorps ou vont devenir des cellules mémoires pour faciliter une réponse plus rapide en cas de réinfection par le même pathogène (Wedemeyer, 1996).

### 3.2. *Mise en place des mécanismes non-spécifiques après un stress et une régulation du cortisol*

Le système immunitaire non-spécifique est influencé par de nombreux facteurs. Premièrement, il possède une grande variabilité due aux traits génétiques. Ensuite, il subit l'influence de nombreux facteurs externes comme la température, la pollution, le régime alimentaire, la présence d'immunostimulants, ainsi que notre paramètre d'étude : le stress (Magnadóttir, 2006).

Les glucocorticoïdes, dont la production est stimulée suite à un stress, exercent une activité immunosuppressive de manière paracrine directe (Flik *et al.*, 2006). Ils provoquent donc une

sensibilité accrue aux pathogènes (Gilles, 2006 ; Calvino, 2003 ; Saeij *et al.*, 2003 ; Kawano *et al.*, 2003). De nombreuses réactions des paramètres de l'immunité sont dues à l'action du cortisol (Tort *et al.*, 2004). On constate généralement une baisse de la phagocytose (Kawano *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2000 ; Esteban *et al.*, 2004 ; Yin *et al.*, 1995 ; Ortuño *et al.*, 2001), une diminution de l'activité du complément (Ortuño *et al.*, 2001 ; Boshra *et al.*, 2006) ainsi qu'une réduction de la sécrétion d'histamines par les basophiles (Yin *et al.*, 1995). En revanche, l'effet du cortisol sur l'activité des macrophages et des granulocytes neutrophiles n'est pas clair. Il est donc parfois difficile d'interpréter les effets sur le système immunitaire sur un unique type cellulaire. Dans cette optique, il est intéressant d'associer des études *in vivo* et *in vitro* pour étudier les effets du cortisol. Par exemple, *in vitro*, le cortisol n'affecte pas la fonction de phagocytose ni d'explosion respiratoire à concentrations physiologiques. Par contre à des concentrations pharmacologiques ( $10^{-1}$  mM), la phagocytose, la quantité de réactifs oxygénés et de la peroxydase diminuent (Esteban *et al.*, 2004 ; Weyts *et al.*, 1998c). Un autre exemple, qui témoigne de la délicatesse d'extrapoler des effets *in vivo* à tous les types cellulaires, est le cas de l'explosion respiratoire. Son activité chez les cellules rénales exposées à un stress aigu est accrue alors que l'effet moyen sur l'ensemble des cellules est nul (Pulsford, 1994). Des études récentes ont mis en évidence un rôle anti-inflammatoire du cortisol chez les poissons. Effectivement, dans l'étude de Saeij (2003) chez la carpe, l'augmentation de cortisol empêche l'induction des mécanismes de défense engendrés normalement par l'entrée du pathogène *Trypanoplasma borreli* dans l'organisme. Dans ce cas, l'expression d'interleukine- $1\beta$ , du facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale, de l'interféron  $\gamma$  et des autres cytokines pro-inflammatoires n'est plus induite (Saeij *et al.*, 2003 ; Kawano *et al.*, 2003 ; Yin *et al.*, 1995 ; Fast *et al.*, 2008). Inversement, les cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ ) sont stimulées par le cortisol. Les glucocorticoïdes du stress contrôlent donc l'expression de cytokines via plusieurs mécanismes. Ainsi, après la liaison entre le glucocorticoïde (GC) et son récepteur cytosolique, le complexe activé se déplace pour interagir avec le GRE qui est une région promotrice et de régulation de gènes. De plus, ce complexe peut inhiber directement, par interaction protéine-protéine, le facteur de transcription like activator protein-1 (AP-1), le cAMP responsive element binding protein (CREB), et le nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), tous trois impliqués dans l'action des cytokines. Par exemple, le NF- $\kappa$ B, qui sera phosphorylée en cas d'intrusion de pathogène, pourra alors entrer dans le noyau et induire la production d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  (Saeij *et al.*, 2003). Les GC favorisent la production d'une protéine inhibitrice de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Au final,

les GC inhibent donc la production de cytokines pré-inflammatoire pour éviter une réponse inflammatoire excessive (Yin *et al.*, 1995 ; Saeij *et al.*, 2003 ; Fast *et al.*, 2008). Les GC affectent en plus les IL-1 par une déstabilisation des ARNm (Engelsma *et al.*, 2002).

Toujours dans un but anti inflammatoire, le cortisol diminue la production d'intermédiaires d'oxygène réactif et d'oxyde nitrique chez les macrophages (Esteban *et al.*, 2004, Kawano *et al.*, 2003). Une autre grande caractéristique du cortisol est son rôle dans la balance prolifération/apoptose des cellules immunitaires. Il inhibe l'apoptose des granulocytes neutrophiles (Esteban *et al.*, 2004). Quant aux thrombocytes, ils restent relativement stables car le cortisol n'a pas d'effet sur leur apoptose (Wojtaszek *et al.*, 2002). Cette observation est en contradiction avec l'étude d'Espelid *et al.*, 1996 qui constate que les thrombocytes diminuent lors d'un stress chronique, alors qu'un stress aigu ne les affecte nullement. Cette éventuelle contradiction s'explique peut être par le fait que tous les effets du stress ne sont pas contrôlés par le cortisol.

Enfin, un stress aigu augmente l'activité des lysozymes dans le plasma tandis qu'un stress chronique la diminue (Fevolden *et al.*, 2002 ; Iwama *et al.*, 1997 ; Yin *et al.*, 1995). Cette réponse des lysozymes est variable selon les espèces. Ainsi, la truite montre une réponse après 10 minutes, le saumon réagit après 30 minutes tandis que d'autres espèces n'ont aucun changement significatif (Demers et Bayne, 1997).

### 3.3. Mise en place des mécanismes spécifiques après un stress et une régulation du cortisol

Le stress induit des mécanismes de défense via des modifications des cellules du système immunitaire spécifiques. Effectivement, le cortisol induit un changement significatif dans la composition des leucocytes chez la carpe (*Cyprinus carpio*) malgré que leur nombre par unité de sang reste pratiquement constant. Il y a essentiellement une profonde lymphopénie et eosinopénie déjà visibles au bout de 24h après injection de cortisol. Celles-ci sont compensées par une augmentation du nombre de granulocytes neutrophiles et des cellules de la lignée granulocytaire (promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes) (Wojtaszek *et al.*, 2002). Selon Maule et Schreck (1990), le phénomène de diminution des leucocytes n'est visible que dans la rate et le sang chez *Oncorhynchus kisutch*, ce qui pourrait être la manifestation de différences de sensibilité selon les organes entre les familles de poissons. Dans tout les cas, une des raisons de la déplétion des lymphocytes

circulant est la redistribution vers le compartiment extravasculaire (Rotllant *et al.*, 1997). L'autre raison est l'augmentation de leur apoptose. Cette mort cellulaire est due à une sensibilité accrue aux ROI/RNI. En effet, la diminution de l'activité de détoxification des enzymes glutathione-S-transferase et glutathione reductase, observée après un stress, n'assure plus une concentration de GSH suffisante. Or, les lymphocytes B activés du sang sont particulièrement affectés par leur faible capacité à maintenir un bon niveau de GSH contrairement aux phagocyte et aux neutrophiles (Saeij *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2000 ; Espelid *et al.*, 1996). On constate ainsi la diminution des cellules produisant des anticorps (Kawano H. *et al.*, 2003 ; Ruane *et al.*, 2000 ; Iwama *et al.*, 1997 ; Saeij *et al.*, 2003 ; Stolte *et al.*, 2006 ; Weyts *et al.*, 1998c ; Espelid *et al.*, 1996 ; Harris *et al.*, 2000).

En plus de ces effets anti-prolifératifs, le cortisol inhibe la sécrétion d'interleukines like factor impliqué dans la différenciation des lymphocytes (Yin *et al.*, 1995). Il semble également accroître la capacité de phagocytose chez les lymphocytes B contrairement aux cellules de l'immunité non spécifique (Weyts *et al.*, 1998a). L'ensemble de ces impacts est encore plus spectaculaire lorsqu'ils sont mesurés par administration de cortisol sur des cultures tissulaires plutôt qu'*in vivo* (Espelid *et al.*, 1996) ; ce qui suggère que ces effets du stress passent par la voie de transduction glucocorticoïde. Ces effets du cortisol sur les lymphocytes conduisent à une diminution des IgM plasmiques (Harris *et al.*, 2000 ; Ratan Saha *et al.*, 2003) et des anticorps neutralisant les virus (Espelid *et al.*, 1996). Il a été également démontré que l'apoptose des leucocytes provoquée par le cortisol se fait via la fixation aux GR (Weyts *et al.*, 1998b ; Weyts *et al.*, 1998c). D'ailleurs la quantité de GR à la surface des leucocytes augmente avec la concentration en cortisol (Weyts *et al.*, 1999). Or, cette observation doit être modérée par d'autres découvertes. D'une part, Maule et Scherck en 1991 montrent que l'affinité des GR est plus faible en cas de stress chronique, ce qui suggère que le paramètre « nombre de récepteurs » est insuffisant pour évaluer la réceptivité du tissu au cortisol. D'autre part, il existe une variabilité de réponse inter-organes car le nombre de GR augmente pour l'ensemble des leucocytes mais ne diminue par exemple pas dans les branchies.

#### **4. Modulation des réponses au stress en fonction de la domestication**

La domestication est définie comme étant les conditions dans lesquelles la reproduction, le soin et la nourriture des animaux sont plus ou moins contrôlés par l'homme (Hale, 1969). Cela est



caractérisé par des changements génétiques visibles au niveau du comportement, de la morphologie ou de la physiologie. La domestication peut être rapprochée à une sélection naturelle en vue d'augmenter l'adaptation des animaux concernés dans un environnement particulier. Dans cette optique, on devrait pouvoir observer des modifications génétiques et phénotypiques au cours des générations. La domestication intervient lorsqu'on réalise une sélection des reproducteurs sur le long terme et en continu pour favoriser la tolérance aux événements stressants (Branson, 2008).

L'élevage de la perche est une piste intéressante pour la diversification des produits en aquaculture. Avant de pouvoir parvenir à réaliser des élevages intensifs, les caractéristiques de cette espèce doivent être connues et compatibles avec les méthodes d'élevage en vue d'une rentabilité intéressante (Fontaine, 2004). N'étant que très peu domestiquée, la perche est très sensible aux stress qui sont omniprésents en aquaculture. Il est donc intéressant d'étudier si la domestication pourrait atténuer les effets délétères du stress qui se marquent sur la croissance, la reproduction et l'immunité.

#### *4.1. Effets de la domestication sur la réponse au cortisol*

Les études sur les effets de la domestication sur la réponse au stress sont quasiment inexistantes. Cependant, quelques travaux ouvrent des perspectives de recherche intéressantes. Suite à un stress répété l'augmentation du taux de cortisol provoqué initialement revient au taux normal sans stimulus stressant (Kawano *et al.*, 2003; Hosoya *et al.*, 2007). Si on afflige un stress aigu par la suite sur les mêmes individus la réponse au niveau du cortisol est plus faible que sans stress chronique effectué préalablement (Hosoya *et al.*, 2007). Cela est dû à l'augmentation des récepteurs glucocorticoïdes dans l'hypothalamus qui augmente le feed-back négatif décrit précédemment (Trenzado *et al.*, 2003 ; Iwama *et al.*, 1997). Ce phénomène relève de l'habituation. Le phénomène d'habituation est présent en aquaculture lors de perturbations répétées (Iwama *et al.*, 1997). Cependant, il n'est pas évident de relier ce phénomène d'habituation à la capacité du poisson à transmettre cette réponse au stress à sa descendance. Pourtant, la mise en place de lignées de truites sensibles et insensibles au stress a montré que le paramètre stress est un facteur héritable chez les salmonidés. En effet, il n'y a aucun doute qu'un plus faible taux de réponse aux stress soit un avantage pour les poissons et que ce caractère pourrait être sélectionné positivement (Fevolden *et al.*, 2002 ; Pottinger, 2006).

D'ailleurs, le taux de cortisol émis après un stress est plus bas chez des truites domestiquées que chez des individus sauvages élevés dans les mêmes conditions (Lepage *et al.*, 2000). En outre, la truite, qui est un poisson depuis longtemps domestiqué (Jentoft *et al.*, 2005), présente une réponse au stress au niveau des concentrations en glucose 3 fois plus basses et moins persistantes en comparaison de celui des perches (Acerete *et al.*, 2004). Tandis que le stress est un paramètre héritable chez les salmonidés, il est opportun de s'interroger sur l'extrapolation à une autre famille de poissons, les percidés.

#### 4.2. Base génétique

Les traits liés à la domestication sont partiellement héritable (Iwama *et al.*, 1997). La différence de cortisol en réponse au stress est visible aussi bien au niveau des souches que des familles et peut donc être considérée comme un trait à une composante génétique suffisante pour réaliser une sélection (Fevolden *et al.*, 2002). Il est possible de sélectionner artificiellement des truites et des carpes, qui après un stress, ont un taux de cortisol faible dans le plasma (Kawano *et al.*, 2003) ou au contraire une concentration de cortisol élevée. Ce caractère a un taux d'hérabilité réalisée ( $h^2$ ) de 0,50. Les deux lignées sélectionnées possèdent des combinaisons différentes de stratégies physiologiques et comportementales pour lutter contre le stress. Les individus à haut taux de cortisol affichent une réponse qui s'apparente au modèle réactif présent chez les mammifères. Tandis que les poissons à taux bas de cortisol sont du type proactif mieux adapté aux conditions d'élevage (Branson, 2008 ; Pottinger, 2006). Les truites présentant un plus faible taux de réponse au stress ont d'ailleurs une meilleure croissance que celles qui produisent plus de cortisol si celles-ci sont élevées en co-culture alors qu'en bacs séparés le poids reste identique (Van Weerd et Komen, 1998). La composante génétique de la croissance n'est donc pas due à un trait morphologique mais à un trait comportemental grâce à une meilleure recherche, prise et assimilation de la nourriture (Pottinger, 2006). Le même mécanisme de sélection est effectué sur l'activité des lysozymes à la suite d'un stress avec une hérabilité réalisée de 0.32 (Fevolden *et al.*, 2002). Ce dernier paramètre semble plus stable que le cortisol. En effet, pour des truites sélectionnées pour leur haut et bas taux de cortisol en réponse au stress on constate respectivement une haute et basse activité de lysozymes alors que les différences de cortisol entre les 2 lignées peuvent être insignifiantes dans certaines conditions (Fevolden et Røed, 1993). Il n'y a donc pas de

corrélation entre les deux traits sélectionnés. Cela pourrait être dû à la façon d'appliquer le stress et s'il est perçu comme aigu ou plus prolongé (Fevolden *et al.*, 1999). De plus, la lignée à haut taux de cortisol indique une suppression de l'activité du complément significative par rapport à la seconde lignée (Fevolden et Røed, 1993). Les différences génétiques entre les deux souches à haute et basse activité du lysozyme affectent la résistance des individus lors d'un challenge test. Il y a une plus forte mortalité chez la lignée à haute activité du lysozyme lors de l'infection à *Aeromonas salmonicida*. L'immunité reste cependant très influencée par le statut physiologique de l'individu au moment du stress et il est donc difficile de prouver le lien entre l'activité des lysozymes et les traits de maladie (Røed *et al.*, 2002). Mais, ces études soulignent que la réponse immunitaire suite à un stress est un facteur potentiellement modulé par la domestication.

## **II. Introduction, contexte et objectifs du mémoire**

La littérature met en évidence l'existence de mécanismes physiologiques et immunitaires de sensibilité au stress chez les animaux, y compris les poissons téléostéens. Ainsi, l'application d'un stress provoque en premier lieu une réponse adaptative marquée par l'augmentation de la glycémie et du cortisol. Ensuite, lorsque le phénomène persiste, des effets délétères se manifestent, notamment sur le système immunitaire. Comme nous l'avons montré lors de l'introduction, des effets du stress sur l'immunité sont attribuables au cortisol, principal corticostéroïde chez les poissons. Par exemple, il régule l'activité de phagocytose (Kawano *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2000 ; Esteban *et al.*, 2004 ; Yin *et al.*, 1995 ; Ortuño *et al.*, 2001), induit une baisse de l'activité du complément (Ortuño *et al.*, 2001 ; Boshra *et al.*, 2006) et des variations du nombre de leucocytes (Yin *et al.*, 1995). Le cortisol pour agir se lie aux récepteurs glucocorticoïdes, récepteurs nucléaires qui agissent comme facteurs de transcription ligand-dépendant. Cependant, rien n'implique que cette voie de signalisation soit activée pour contrôler l'immunité. Des études sur la relation entre le stress, le cortisol et l'immunité ont déjà été effectuées chez les salmonidés ou les cyprinidés. Par contre il existe peu d'informations chez les percidés. Dans ce contexte, il est judicieux d'étudier les phénomènes qui pourraient diminuer les impacts délétères du stress. La domestication pourrait être une voie intéressante. En effet, les niveaux de cortisol circulants et certains paramètres immunitaires tels que le lysozyme sont des paramètres à fortes héritabilité, susceptibles donc d'être modulés par le processus de domestication (Kawano *et al.*, 2003 ; Fevolden *et al.*, 2002 ; Fevolden et Røed, 1993).

Ce mémoire s'intègre dans le programme de recherche FRFC n° 2. 4570. 06 ayant pour titre « Etude de la relation entre le patrimoine génétique et les niveaux successifs de réponses primaire (endocrinienne), secondaire (physiologique) et tertiaire (cellulaire) chez le poisson téléostéen, *Perca fluviatilis* L., en condition de stress ». Deux universités coopèrent pour ce projet, l'Université de Liège (Centre de Formation et de Recherches en Aquaculture) et les Facultés Universitaires N.D. de la Paix de Namur (Unité de Recherches en Biologie des Organismes). Le projet étudie les réponses de larves, de juvéniles et de géniteurs de perches présentant divers degrés de domestication et soumis à différents stressseurs.

**L'objectif de ce mémoire est premièrement de caractériser les effets physiologiques et immunologiques d'un stress de manipulation, ensuite de déterminer si la domestication module cette réponse, et enfin de vérifier si les effets du stress passent par le cortisol et le récepteur glucocorticoïde.**

Pour cela, nous tenterons d'abord de vérifier si un stress de manipulation (aigu ou répété) induit ou non une perturbation de l'immunité des juvéniles de perche. Si la réponse est affirmative, nous tenterons de visualiser l'influence de la domestication sur cette réponse au stress.

Premièrement, nous réaliserons sur des perches de 2 générations (F1, F4) les mesures des paramètres classiques de réponse primaire à un stress aigu (glucose, cortisol, mesure semi-quantitative des récepteurs glucocorticoïdes). Cela nous permettra d'estimer l'intensité avec laquelle le stress est perçu par les différentes générations. Ensuite la réponse secondaire sera évaluée par la mesure des paramètres de l'immunité (lysozyme, complément, immunoglobulines).

Dans un second temps, nous évaluerons grâce à un test biologique *in vitro* de culture de rate si le cortisol et son récepteur glucocorticoïde régulent directement les paramètres immunitaires mesurés *in vivo* après le stress. En effet, grâce à l'utilisation d'un antagoniste aux récepteurs glucocorticoïdes, nous pourrions connaître si ce récepteur est bien la voie d'action du cortisol.

### **III. Matériels et méthodes**



Figure 4: Circuit fermé et installations pour l'expérience de stress aigu répété (S. Lambert).



## ***Expérience 1 : Effet du stress aigu répété***

### **A. Protocole expérimental**

L'expérience porte sur des juvéniles de perche de génération F1 et F4 élevés au centre de formation et de recherche en aquaculture de Tihange (CEFRA). A J0, les F4 pèsent en moyenne 78.6g +/-28.6g et les F1 63.5 +/- 19.3g. Pour chaque niveau de domestication, les poissons sont répartis en 6 groupes dans des bassins de 80 litres selon une densité d'environ 40 kg/m<sup>3</sup>, soit 45 poissons par bacs. La moitié des groupes subira un stress aigu répété et l'autre moitié ne sera pas manipulé (poissons contrôles). Chaque condition (F1 contrôle, F1 stressé, F4 contrôle, F4 stressé) est donc testée en triplicat et disposée aléatoirement dans le circuit fermé. Après le transport, l'acclimatation des poissons dure un mois. Après cette période, le stress d'exondation par vidange totale des bacs est appliqué tous les 2 jours et ce pendant 25 secondes. Les bassins abritant les poissons contrôles sont isolés par des séparations en bois les empêchant de voir les autres manipulations et par un bac vide laissé entre les bacs stressés et les contrôles (figure 4). Des prélèvements de sang, rate et foie sur l'ensemble des groupes ont été effectués à J0, J10, J20 et J46 aléatoirement en veillant à laisser un jour sans stress avant le prélèvement. Durant toute l'expérience, les paramètres physico-chimiques ont été surveillés toutes les semaines (pH, nitrite, nitrate, ammonium, T°, oxygène dissout).

### **B. Prélèvement du matériel biologique**

Cinq poissons sont prélevés par bacs aux différents temps mentionnés ci-dessus. Ils sont plongés dans du MS222, éthyl 3-aminobenzoate (A5040-25G, Sigma) à raison de 180mg/L d'eau. Le prélèvement se déroule ensuite en 2 parties.

Prélèvement sanguins : Un chronomètre permet de ne pas dépasser 5 minutes entre la prise à l'épuisette des poissons et la fin du prélèvement sanguin. En effet, après ce délai le cortisol produit lors du stress de capture pourrait être libéré dans la circulation sanguine et fausser le dosage du cortisol. La prise de sang se fait à l'aide de seringue d'1 ml (volume maximum prélevé) et d'aiguille d'épaisseur 0.5 mm. L'endroit choisi pour piquer le poisson se situe à l'arrière de la nageoire anale dans la veine caudale. Le sang est ensuite transféré dans des tubes eppendorf et conservé à 4 °C. Une étape de centrifugation à 9000rpm pendant 5 minutes permet d'isoler le sérum qui sera aliquoté en plusieurs tubes et conservé à -20°C.

Prélèvements des organes : après la prise de sang et l'euthanasie des poissons par dislocation cérébrale, ceux-ci sont pesés et disséqués. Les rates et foies sont pesés et placés dans des cryotubes conservés dans l'azote liquide puis à -80°C.

## C. Méthodes d'analyse

### 1. Dosage du glucose

**Principe** : La première étape de déprotéinisation permet l'oxydation du D-glucose en D-glucono-1,4-lactone et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce dernier oxyde par l'action de la peroxydase un chromogène jusque là incolore qui augmente la densité optique proportionnellement au D- glucose de départ.

**Méthode** : Le plasma est déprotéinisé grâce à l'ajout de 200 µl d'acide perchlorique 0.33 M pour 100 µl d'échantillon. Après mélange, on centrifuge 10 minutes à 3000 tours. Pour 25 µl de surnageant on ajoute 2 ml de solution réactionnelle. Cette solution se compose de 16 mg de glucose oxydase lyophilisée Grad II (Boehringer à 20000 UI/80 mg), 1.5 mg de peroxydase lyophilisée Grad II (Boehringer à 10000 UI/51 mg), 250 mg de 2,2'-diazino-3-éthyl-benzothiazoline-6-ulfonate (ABTS) (Boehringer) dans un litre de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5. Les échantillons, après avoir été mélangés, sont placés au bain marie pendant 15 secondes à 38 °C. La densité optique est ensuite lue à 436 nm. De plus, une courbe étalon est réalisée à partir d'un standard de glucose à 1mg/ml.

### 2. Dosage du cortisol

**Principe** : Le kit DRG Cortisol Elisa EIA-1887 utilisé se base sur une réaction immuno-enzymatique compétitive. Les micro-plaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule de cortisol. Le cortisol endogène des échantillons entre en compétition avec du cortisol conjugué à la HRP (Horse Rabbit Peroxydase) pour la liaison à l'anticorps. Après incubation, le conjugué non lié est éliminé durant le lavage des puits. La quantité de peroxydase liée, et donc l'intensité de coloration suite à l'addition de solution substrat, est inversement proportionnelle à la concentration de cortisol contenu dans les échantillons.

**Méthode** : Des pools sont réalisés avec 10 µl du plasma de 5 poissons prélevés dans un même bac et cela pour les 12 bacs de l'expérience.



Une gamme allant de 0 à 400 ng/ml est préparée en duplicat ainsi que 2 standards de quantité connue (35 ng/ml et 300 ng/ml). Ces solutions ainsi que les échantillons en duplicat sont répartis sur une plaque à raison de 20 µl par puit. 200 µl de cortisol conjugué à l'enzyme sont rajoutés dans chaque puits. La plaque est mélangée 10 secondes puis incubée pendant une heure à température ambiante. Les puits sont lavés 3 fois à l'aide de 400 µl d'une solution de lavage. Les gouttelettes résiduelles sont enlevées à l'aide de papier absorbant en tapotant les puits dessus. On rajoute alors 100 µl d'une solution contenant le substrat de l'enzyme. Une coloration jaune se forme suivant la concentration en cortisol. Avant la lecture une incubation de 15 minutes et l'ajout de 100 µl d'une solution stop est nécessaire. La densité optique est lue à 450 nm dans les 10 minutes.

### **3. Quantité relative d'ARNm des récepteurs Glucocorticoïdes**

**Principe :** Pour connaître la quantité d'ARNm des récepteurs glucocorticoïdes il faut d'abord extraire tout l'ARN du tissu étudié. Ensuite cet ARN est transformé en ADNc grâce à la reverse transcription. La dernière étape consiste à amplifier uniquement une partie de cet ADN qui correspond aux gènes codant pour les récepteurs glucocorticoïdes à l'aide d'amorces spécifiques du gène, de la Taq polymérase et de nucléotides. Lors de cette amplification, le SYBR-Green, un agent intercalant fluorescent s'insère dans la chaîne d'ADN uniquement si elle se trouve sous la forme double brin. Au fur et à mesure des cycles, le signal quitte le bruit de fond, suit une amplification de forme sigmoïde jusqu'à un seuil de saturation. Cette courbe est tracée par le logiciel d'exploitation « I-cycler » (Biorad). Un seuil de fluorescence est fixé pour lequel l'amplification est dans la phase exponentielle et hors du bruit de fond pour obtenir une efficacité entre 70 et 120. Une efficacité de 100 correspond à une multiplication par 2 de la quantité du gène amplifié après un cycle de PCR. En analysant le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil, on peut connaître la quantité relative d'ARNm des récepteurs glucocorticoïdes présente au départ par comparaison avec les CT obtenues pour chaque point d'une dilution successive d'un mélange d'ADNc. La quantité de transcrits est ensuite normalisée par rapport aux ARN d'un gène de référence, stable dans la situation physiologique considérée.



Figure 5: Thermocycleur (S. Lambert)

- Extraction d'ARN

Les échantillons d'organes (foies, rates) prélevés sur les perches sont placés sur glace. A 4°C, les tissus sont d'abord broyés à l'aide d'un polytron dans des tubes eppendorf 1.5 ml préalablement stérilisés. Ils contiennent 600 µl de TRIzol (15596-018, Invitrogen) pour un maximum de 200 mg de tissu. Le TRIzol contient de l'isothiocyanate de guanidium qui est un inhibiteur des RNases, du phénol qui facilite la solubilisation des protéines et de l'acétate de sodium qui précipite les acides nucléiques. Ces réactions se font à température ambiante pendant 5 minutes. 200 µl de Chloroforme sont alors ajoutés dans chaque tube. Un mélange vigoureux à la main des tubes est réalisé. Ceux-ci sont placés 2-3 minutes à température ambiante. Une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C permet de séparer ARNm, l'ADN et les protéines. La phase aqueuse (surnageant) qui contient les ARNm est prélevée puis placée dans des nouveaux eppendorf stériles pour être concentrés par précipitation dans l'alcool. La PCR nécessite une mesure précise des ARN totaux à l'aide d'un spectrophotomètre qui calcule l'absorbance pour des longueurs d'onde de 260 et 280 nm. Le quotient DO280/DO260 permet de déduire la qualité de la préparation d'ARN (présence ou non de contamination par des protéines) et la mesure à 260 nm, la concentration en ARN total de chaque échantillon.

- Reverse transcription

Les échantillons sont dilués de manière à avoir 2 µg d'ARN pour 8µl. Les échantillons sont répartis sur une plaque 96 puits compatible avec le thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf ; figure 5). La suite du protocole est effectuée selon les instructions du kit RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (K1632, Fermentas). Un premier mélange est réalisé contenant des oligo dT à raison de 1 µl par et 3 µl d'eau DEPC par échantillon. 4 µl de ce mix sont ajoutés pour arriver à un volume total de 12 µl par puit. Un vortexage est nécessaire suivi d'une centrifugation pour ramener les gouttes éventuelles au fond des puits. Ce mélange est placé à 70 °C pendant 5 minutes dans le thermocycleur pour dénaturer les brins d'ARN et fixer les amorces. Un deuxième mélange composé de 1µl de RNase inhibition, 2 µl de dNTP et 4 µl de tampon 5X, par échantillon, est rajouté dans chaque puit. Le mélange des différents produits se fait par un vortexage et d'une légère centrifugation si nécessaire. La plaque

est mise à 37 °C pendant 5 minutes. On ajoute encore 1 µl de Reverse Transcriptase qui est vortexé avec le reste du contenu des puits.

Le tout est vortexé puis placé à 42°C pendant 60 minutes suivi de 10 minutes à 70 °C. Les ADNc ainsi obtenus peuvent être stockés à – 20 °C.

- **Real-time Quantitative PCR**

L'ADNc est décongelé et réparti sur plaque pour obtenir une dilution 1/20, soit 5 µl d'ADNc et 95 µl d'eau stérile. 5 µl de cette dilution sont prélevés et distribués en duplicat pour les échantillons et en triplicat pour la gamme sur une plaque Micro Amp optical 96-well reaction plate (N801-0560, Applied Biosystems). La gamme est composée d'un pool d'ADN dilué au 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Un volume de 15 µl de mix est ajouté dans chaque puit. Il est composé de 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (P/N 4367659, Applied Biosystems), 2,5 µl d'amorces sens 5 µM et 2,5 µl d'amorces anti-sens 5 µM par puit. Un duplicat de ce mix est utilisé comme blanc afin de vérifier l'absence de contaminations dans le mix et l'eau. La plaque est couverte par un film plastique de type PCR compatible (4360954, Applied Biosystems).

L'amplification de l'ADNc se fait en plusieurs étapes de durée et de température variable : une étape initiale de 2 minutes à 50 °C puis 10 minutes à 95 °C et 40 cycles de 15 secondes à 95°C (dénaturation) et 1 minute à 58 °C (hybridation/élongation). Après calcul de la quantité d'ARNm du récepteur glucocorticoïdes, les valeurs sont normalisées par celles d'un gène ménage dont l'expression ne varie pas. Seules les amorces (concentration) et la dernière étape d'amplification, qui se fait à 56°C au lieu de 58°C, changent. La spécificité des amorces est vérifiée par la lecture d'une courbe de fusion de l'ADNc amplifié. La présence d'un seul pic confirme cette spécificité.

#### **4. Dosage des Immunoglobulines**

**Principe** : Ce dosage consiste à entraîner la précipitation des immunoglobulines par du PEG 10000 (92897, Fluka) et de doser la quantité d'Ig par différences entre la quantité de protéines avant et après la précipitation.

$$\text{Protéines totales} - (\text{protéines totales} - \text{Ig}) = \text{Ig}$$

**Méthode** : Pour obtenir la quantité de protéines totales, le sérum est dilué au 1/10. 5 µl de la solution diluée sont déposés dans des cuvettes en présence d' 1 ml de

réactif de Bradford (500-006, Bio-Rad) dilué préalablement au cinquième, Le dosage est effectué en duplicat. Une gamme allant de 0 à 25 µg de protéines est réalisée également en duplicat avec de la BSA 1µg/µl. Pour obtenir la quantité de protéines totales sans les Immunoglobulines, le sérum est dilué de moitié avec du PEG 12%.

Le mélange est vortexé pendant 2h. Une centrifugation à 1000g pendant 10 minutes est effectuée pour précipiter les IgG. Le surnageant est dilué à raison de 5 µl pour 45 µl d'eau distillée. 5 µl sont prélevés et mélangés à 1 ml de réactif de Bradford 1/5 dans des cuvettes en duplicat. Toutes les cuvettes sont lues à 595 nm dans les 10 minutes après l'ajout du Bradford.

## **5. Dosage du lysozyme**

**Principe :** L'action lytique du lysozyme sur des bactéries est mesurée grâce à la baisse de densité optique provoquée par cette réaction. La diminution de la DO est proportionnelle à la concentration en lysozyme.

**Méthode :** Les rates sont pesées pour ajouter une quantité de 2,33 ml de tampon C par gramme de tissu. Ce tampon C est composé de 100 ml de tampon phosphate de sodium 0.067 M (soit 17.9 gr de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> pour 1 litre d'eau, pH 6.2), de 100 µl triton X-100, de 99 ml d'éthanol 95% et 1 ml d'acide acétique. Les rates sont broyées à l'aide d'un polytron puis centrifugées à 10000g pendant 2 minutes. Le surnageant obtenu est prélevé et placé dans de nouveaux tubes. Un standard de lysozyme (46400 U/ml) est préparé en ajoutant 20 mg de lysozyme (L-6876, Sigma) à 20 ml du même tampon phosphate que celui utilisé pour préparer le tampon C. Un deuxième standard est préparé à l'aide de 215 µl du premier standard plus 9.785 ml de tampon phosphate afin d'obtenir 1000 u/ml. La gamme est ainsi facilement réalisable à partir de SM en le diluant de 25 à 400 u/ml toujours dans du tampon phosphate. Enfin, la solution de bactéries est préparée en pesant 30 mg de *Micrococcus lysodeikticus* (M3770-25G, Sigma) pour 50 ml de tampon phosphate. Les échantillons et la gamme sont répartis en duplicat dans une plaque à raison de 2 µl d'échantillons pour 150 µl de bactéries. La plaque est incubée à température ambiante avec une lecture à 450 nm à T0 puis toutes les heures jusque T6h pour le dosage sur la rate en veillant à faire un mélange au vortex toutes les demi-heures. Pour le plasma les lectures se font jusque 15 à 25 minutes.





Figure 6: Osmomètre à point de congélation (S. Lambert)

#### *D. Analyse statistique*

Les outils informatiques utilisés pour l'expérience de stress aigu répété sont « Excel » et « Statistica 5.5 ». Les facteurs sont le traitement et la domestication et le temps. Le facteur domestication présente 2 modalités (F1/F4), le facteur traitement 2 (Stress/Contrôles) et le facteur temps 4 (J0, J10, J20, J46). Ces 3 facteurs explicatifs sont fixes, croisés et non hiérarchisés.

La variable étant toujours quantitative, cela nous mène à la décision de réaliser des ANOVA 3 avec préalablement vérification de l'homoscédasticité des variances par un test de Bartley ainsi que la normalité avec un test de Kolmogorov-Smirnov. Si une ou les 2 conditions ne sont pas vérifiées, une transformation log et/ou racine est préalablement réalisée. Lorsque l'ANOVA 3 met en évidence des effets significatifs ( $p < 0.05$ ), un test post hoc LSD vient compléter l'analyse afin de déterminer les différences entre les modalités. Le caractère significatif est placé au seuil  $p < 0.05$ .

### **Expérience 2 : Effet du stress aigu unique**

#### *A. Protocole expérimental*

Le protocole expérimental est similaire à l'expérience précédente excepté la nature du stress et le fait que seule la génération F4 est étudiée. On laisse ces poissons s'acclimater à nouveau sans stress. Un stress aigu d'exondation est alors appliqué pendant une minute et les prélèvements du sang, de la rate et du foie ont lieu 2h, 8h, 24h, 3j après le stress

aléatoirement. A chaque temps, des contrôles n'ayant pas subi le stress sont aussi prélevés. Les poissons sont répartis dans 11 bacs soit 4 bacs stress, 4 bacs contrôles et 3 bacs T0. Dans chaque bacs sont hébergés 14 poissons ce qui donne une densité d'environ 17,5 kg/m<sup>3</sup>.

## *B. Méthodes d'analyse*

Les dosages du glucose, cortisol, des ARNm des glucocorticoïdes, des IgG et lysozymes sont effectués comme cités dans la première expérience. Deux dosages supplémentaires ont été effectués.

### **1. Osmolarité à point de congélation**

**Principe** : L'osmolarité est mesurée à l'aide d'un osmomètre à point de congélation qui détermine le point de congélation du plasma. L'abaissement du point de congélation par rapport à l'eau distillée donne une mesure directe de la pression osmotique. Par exemple, l'eau pure se solidifie à 0°C et une solution aqueuse avec une osmolarité de 1 mOsmol/kg par kilo d'eau se solidifie à -1.858°C.

**Méthode** : Tout d'abord l'appareil (one-ten osmometer, Fiske ; figure 6) doit être calibré grâce à des solutions d'osmolarité connue. Ensuite, 10 µl de plasma sont placés dans un godet prévu pour l'osmomètre et l'osmolarité est lue directement sur l'écran de l'appareil.

### **2. Dosage de l'activité du complément**

**Principe** : Le complément de la perche, contenu dans le sérum, est mis en contact avec des hématies de mouton (72141, Biomérieux) et les reconnaît comme étrangère. Il va réagir en provoquant leur lyse. La densité optique augmente proportionnellement à l'activité du complément. Habituellement, le dosage du complément est basé sur la mesure de l'ACH50 qui est la réciproque de la dilution de sérum correspondant à la médiane entre la lyse totale et la valeur minimale. Cependant un autre dosage sera utilisé.

**Mise au point préliminaire** : Le protocole a été modifié suite à la faible valeur du complément chez la perche associé à une forte couleur du sérum. Une approche par rapport à une courbe étalon est testée pour remplacer les dilutions successives de chaque échantillon. Cette gamme est réalisée avec du complément purifié de cobaye (S1639, Sigma). La notice de ce produit et l'article de Sunyer et Tort, 1995 ont servi de base. La

notice proposant 1 ml d'hématies pour 6.5 ml de sérum, les tests sont entamés avec 10 µl d'hématies pour 60 µl de sérum ce qui est un volume plus réaliste à la vue de nos échantillons. Il s'est avéré que ce volume est suffisant pour la lecture. Nous avons choisi de tester 4 dilutions d'hématies (1, 2, 3 et 5 %) et 3 longueurs d'onde (405, 450 et 590 nm). La dilution 3 % est la mieux adaptée avec une bonne chute de DO et la lecture à 405 nm permet des valeurs élevées et un dosage plus sensible. Après avoir établi qu'il y a bien linéarité pour les dilutions du complément de cobaye entre 1/8 et 1/256, une concentration standard qui entre dans cette gamme doit être déterminés pour les sérums de perche. Les dilutions de 1/16 et 1/32 sont adoptées. L'inquiétude quand à l'interférence de la couleur rouge de certains sérums est écartée en constatant une DO négligeable pour des blancs aux dilutions choisies. Les nécessités de centrifuger pour éliminer les hématies non lysées, de les vortexer régulièrement pour une meilleure lyse et d'avoir un temps d'incubation plus long que les 60 minutes préconisées sont également mises en évidence.

**Méthode :** 60 µl d'échantillons de sérum sont placés aux dilutions 1/16 et 1/32 en duplicat dans une microplaque 96 puits à fonds en U. La dilution se fait dans du tampon véronal (72171, Biomérieux) sur glace. Une gamme est réalisée en diluant du complément de sérum de cobaye purifié de 1/8 à 1/256. 10 µl d'hématies de mouton diluées à 3 % dans du tampon véronal sont rajoutés dans chaque puits. Un blanc est également prévu en mélangeant 10 µl d'hématies 3 % avec 60 µl de tampon véronal. La lyse totale est aussi évaluée en plaçant 10 µl d'hématies 3% avec 60 µl d'eau distillée. Lorsque toutes ces préparations sont placées sur la plaque en duplicat, un vortexage permet de mettre les hématies bien en suspension. La plaque est alors incubée à 37 °C pendant 100 minutes avec vortexage toutes les 20 minutes pour remettre les hématies au contact du complément. A la fin du temps d'incubation la plaque est placée sur glace pour stopper la réaction. Elle est centrifugée à 2000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. 40 µl du surnageant de chaque puits sont replacés sur une nouvelle plaque pour permettre une lecture sans interaction avec les hématies non lysées. L'absorbance est lue à 405 nm.

### 3. Dosage des radicaux libres

**Principe :** Les cellules sont dissociées pour être mises en contact avec le NBT (Sigma, N-6876) qui pourra être fixé par les radicaux produits. La production de forman, évalué par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de départ de radicaux superoxydes.

**Méthode :** Les rates prélevées sont séchées, pesées et placées dans 500 µl de L15 (0.71g dans 50ml d'eau distillée, L4386-1L, Sigma) sur glace. Les rates sont coupées en lamelles puis subissent un passage au tamis cellulaire (100 µm Nylon, 352360, BD Falcon). Le L15 contenant les cellules est récupéré. Cette étape est effectuée une seconde fois. Le tout est centrifugé pendant 5 minutes à 0.6 rcf. Le surnageant est éliminé et le culot subit un deuxième lavage dans 500 µl de L15. On remet en suspension le culot dans 500 µl de L15 pour en prélever 200 µl (100µl en duplicat), le reste servant à constituer un pool pour la courbe d'étalonnage. Après 30 minutes de repos, les échantillons sont centrifugés à 0.6 rcf pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et les culots sont mis en présence de 75 µl de NBT (2 mg de NBT/ml de PBS). La droite d'étalonnage va de 0 à 150 µl de NBT avec ajout de PBS pour un volume final de 150 µl. On incube alors pendant 1 heure. Le surnageant est encore une fois éliminé avec centrifugation de 5 minutes à 0.6 rcf. 280 µl de méthanol sont ajouté puis après vortexage 240 µl de KOH. Les échantillons sont centrifugés à 3500 rpm pendant 5 minutes après avoir reçu 240 µl de N-diméthylformamide. Le surnageant est prélevé et lu à 550 nm.

### C. Analyse statistique

Les mêmes caractéristiques que l'analyse statistique de l'expérience de stress aigu répété seront appliquées ici. Toutefois, nous disposons d'un facteur de moins car seule la génération F4 est utilisée. Nous réaliserons donc des ANOVA 2.

## Expérience 3 : Effet du cortisol sur des cultures tissulaires de rates

### 1. Protocole expérimental

Les rates des perches F4 contrôles de la première expérience sont prélevées. Elles sont ensuite mises en culture avec différents traitements. Le milieu de culture est composé de RPMI (M7278, Sigma) auquel on ajoute 1% d'antibiotique (P4333, Sigma), de l'Hepes 25 mM (H3375-250G, Sigma) et 8% de FBS (Fetal Bovin Serum, A6003-10G, Sigma) déstéroïdé (20 ml de sérum lavé 3 fois avec 0.05g de charbon (C-6241, Sigma), 0.005g de dextran en laissant agir la première fois une nuit puis 1h à 4°C). A ce milieu de culture sont rajoutées différentes hormones à raison de 1 µl/ml de milieu. L'éthanol sert de contrôle. Trois doses finales de cortisol (Sigma, H0888-1G) sont testées (100 ng/ml, 1 µg/ml et 10 µg/ml). Des rates sont aussi incubées avec du RU 486 100 µM (Sigma, M-8046) qui est un antagoniste du récepteur glucocorticoïdes chez les mammifères. Enfin, on teste également

le RU 486 en présence de cortisol 10 µg/ml. Les plaques sont ensuite incubées à température ambiante pendant 48 h avec une agitation légère constante. Le milieu et les hormones sont changés après 24 h d'incubation. Durant toute l'expérience on veille à ne mettre que la rate ou les morceaux de rate provenant d'un même poisson dans un puits pour éviter les phénomènes de reconnaissance du non-soi. Toutes ces manipulations en laboratoire se font sous hôte à flux horizontal pour maintenir des conditions optimales de stérilité.

## **2. Prélèvement du matériel biologique**

Pour chaque dosage 3 plaques de 12 puits doivent être remplies pour avoir ainsi 6 rates de chaque traitement. Pour ces 3 plaques, 12 poissons sont euthanasiés et seules les rates sont prélevées à l'aide d'instruments stériles. Elles sont directement placées dans 1 ml de milieu de culture de préincubation puis coupées en 6 morceaux. Elles sont ensuite transférées dans les boîtes de culture d'incubation.

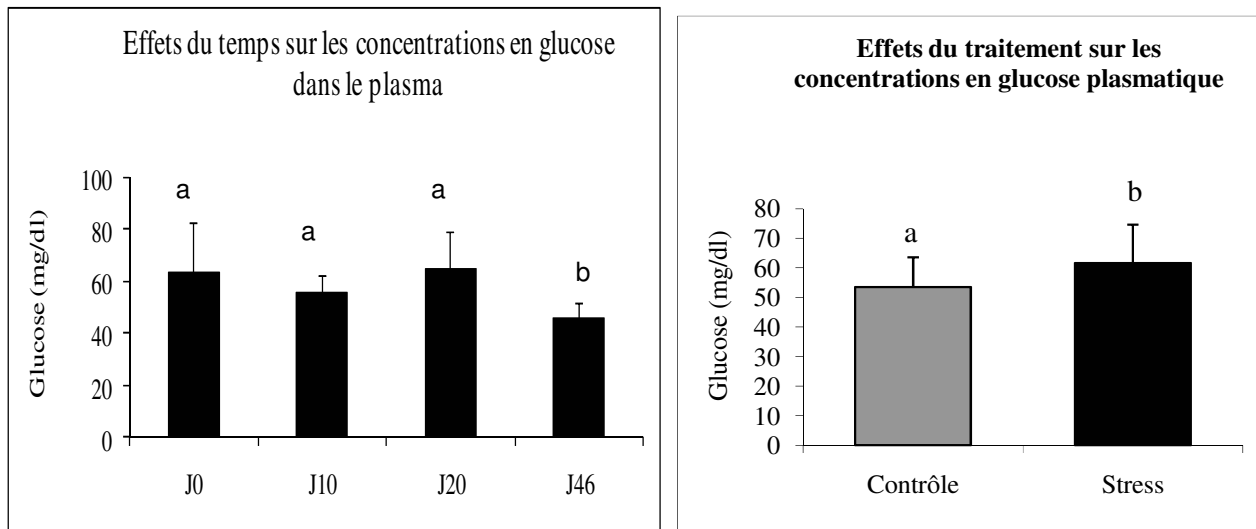
## **3. Méthodes d'analyse**

Les dosages des IgG, des lysozymes, des ARNm des glucocorticoïdes et des radicaux libres produits sont réalisés selon les méthodes décrites pour les expériences 1 et 2.

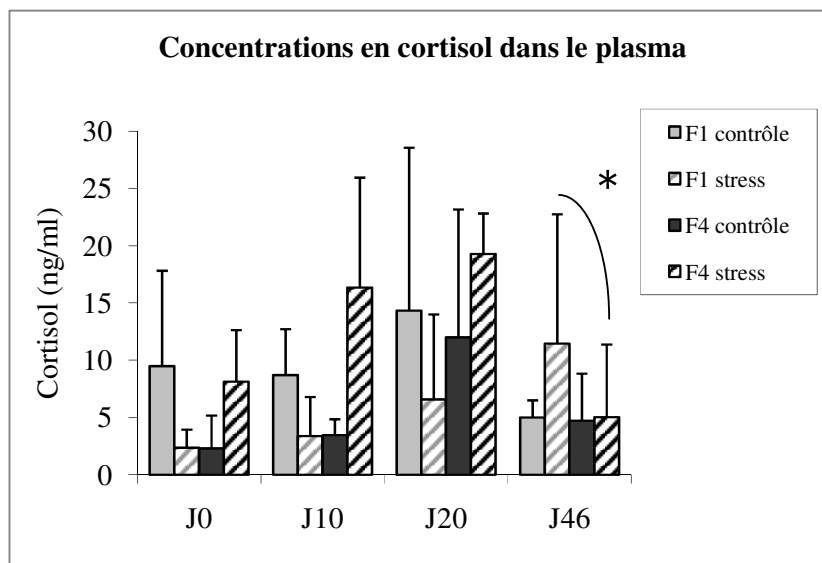
## **4. Analyse statistique**

Le principal facteur est le traitement. Il est qualitatif à 6 niveaux, soit éthanol, cortisol 100ng/ml de cortisol, 1µg/ml de cortisol, 10µg/ml de cortisol 100µM/RU 486, RU 486100µM+cortisol 10µg/ML. La préférence sera ici donnée à des tests non paramétriques tels que le Kruskal-Wallis pour les effets généraux et le Mann-Whitney pour les effets des traitements 2 à 2. Il n'y a donc pas de contraintes sur la distribution des résidus, ni l'homoscédasticité.

## **IV. Résultats**



**Figure 7 :** Variations de la concentration en glucose dans le plasma de l'expérience de stress aigu répété selon les effets du temps (gauche) et du traitement (droite). J0 à 46 : jours de prélèvements. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 12 échantillons (gauche) et 36 (droite) + écart type. a-b : différences significatives.



**Figure 8 :** Variations de la concentration en cortisol dans le plasma au long de l'expérience de stress aigu répété. J0 à 46 : jours de prélèvements. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 3 échantillons + écart type. \* : effets significatifs

Pour mettre en évidence les effets présents pour chaque dosage, les valeurs seront groupées selon le ou les facteurs significatifs présents. Dans les autres cas les graphes généraux seront présentés. Toutefois, les valeurs de chaque modalité seront ajoutées en annexe. Tous les graphiques sont réalisés à partir des données brutes même si les analyses ont parfois subies des transformations. Les graphiques seront présentés avec les écarts types calculés à partir des valeurs. Toutes les analyses statistiques sont présentes en annexes.

### ***Expérience 1 : Effet du stress aigu répété***

#### **1. Dosage du glucose**

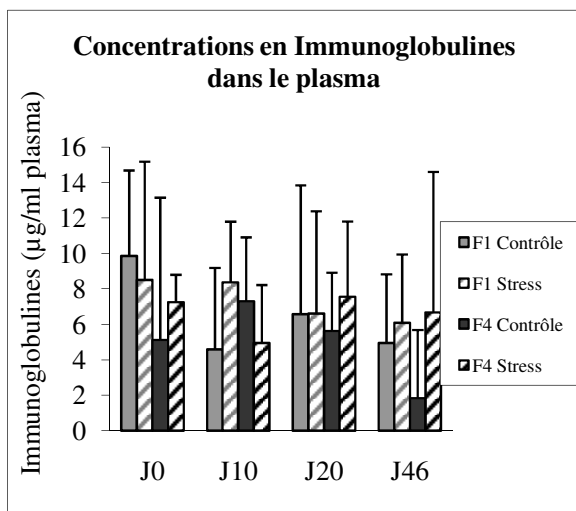
Tandis que la génération n'influence pas sur la concentration en glucose, une variation significative des concentrations est mesurée au cours de l'expérience (figure 7 gauche) et selon le traitement (figure 7 droite). Une baisse du glucose est constatée au cours du temps ( $p=0,0005$ ). Cela se marque par une diminution de la glycémie entre les deux premiers temps de prélèvement et le prélèvement à J46. En effet la valeur moyenne de la glycémie chez les poissons des premiers prélèvements est de 61,49 mg/dl alors que pour celle des poissons prélevés au J46 est de 45,75 mg/dl. Le second effet est celui du traitement ( $p=0,024$ ) avec une glycémie plus faible pour les poissons contrôles (53,5 mg/dl) que ceux stressés (61,6 mg/dl).

#### **2. Dosage du cortisol**

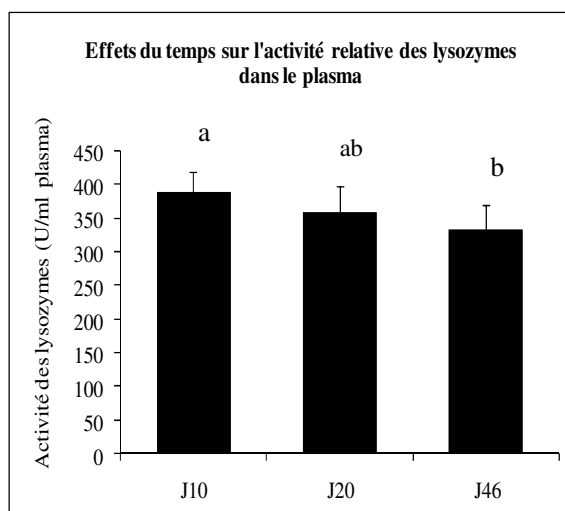
Le profil des niveaux de cortisol plasmatique montre une grande variabilité interindividuelle comme le montre la figure 8. Le niveau moyen de cortisol chez les perches stressées de cette expérience est de 10,34 ng/ml alors que celui des contrôles est plus bas (8,02 ng/ml) mais cette différence s'avère non significative. L'analyse statistique nous informe que l'interaction des facteurs des 3 facteurs (génération, temps et traitement) est significative ( $p=0,048$ ).

L'interaction permet d'abord d'isoler un effet du temps. Ainsi au prélèvement du J20, les poissons stressés de la génération F4 (19,29 ng/ml) présentent un taux de cortisol significativement ( $p=0,045$ ) plus élevé que les poissons de la même condition au J46 (5,02 ng/ml). Un deuxième effet significatif de la génération est visible ( $p=0,033$ ). En effet, au dernier prélèvement les poissons stressés montrent des valeurs en cortisol significativement 2 fois plus élevées lorsque qu'il appartiennent à la génération F1 (11,44 ng/ml) que lorsqu'ils sont de la génération F4 (5,02 ng/ml).

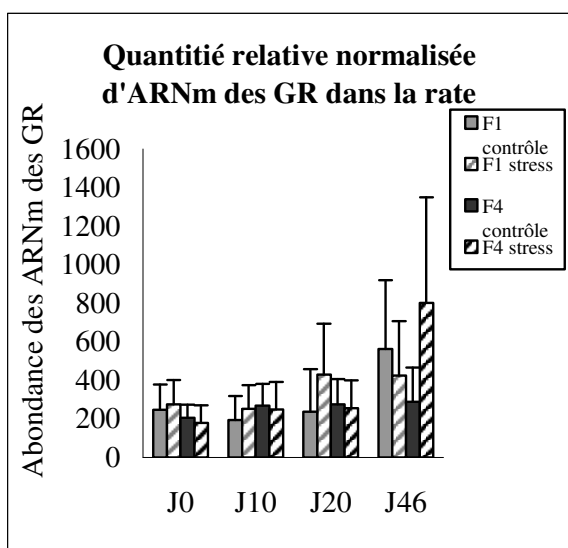




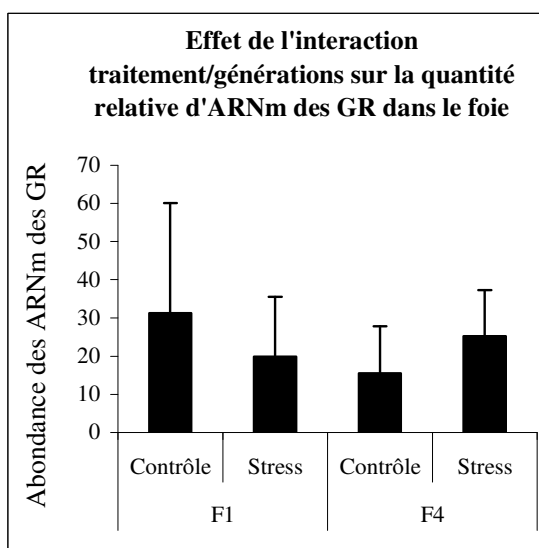
**Figure 9 :** Variation de la concentration des immunoglobulines au long du stress aigu répété. J0 à 46 : jours de prélèvements. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 5 échantillons pour le premier prélèvement et de 10 échantillons pour les autres prélèvements + écart type.



**Figure 10:** Variations de l'activité des lysozymes du stress aigu répété selon le temps. J0 à 46 : jours de prélèvements. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 12 échantillons + écart type. a-b : différences significatives



**Figure 11 :** Variation de la quantité relative, normalisée par le gène 28S, d'ARNm des récepteurs glucocorticoïdes de la rate au long de l'expérience. J0 à 46 : jours de prélèvements. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 3 échantillons pour le premier prélèvement et de 5 échantillons pour les autres prélèvements + écart type.



**Figure 12:** Variations de la quantité relative normalisée par le gène 28S, des ARNm des récepteurs glucocorticoïdes dans le foie selon les effets de l'interaction traitement/générations. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 18 + écart type. a-b : différences significatives

### **3. Dosage des Immunoglobulines**

La valeur moyenne, toutes conditions confondues, est de 6,36 µg/ml de plasma. Aucun des facteurs étudiés ne fait varier significativement ce paramètre physiologique à l'exception de l'interaction des 3 facteurs (figure 9). Pour les poissons contrôles de la génération F4, la quantité d'Ig au jour 10 (7,29 µg/ml de plasma) est significativement supérieure ( $p=0,01$ ) au prélèvement du jour 46 (1,83 µg/ml de plasma). En outre, un niveau plus faible chez les F4 contrôles est constaté par rapport au F4 stressés (6,67 µg/ml de plasma) au dernier prélèvement ( $p=0,01$ ).

### **4. Dosage de l'activité des lysozymes**

Ici encore, ni le stress, ni l'effet génération ont influencé l'activité du lysosyme (figure 10). Par contre, le profil de cette activité montre une baisse significative au cours du temps ( $p=0.013$ ). Plus précisément, une diminution de l'activité de 14,2 % est visible entre le J10 et le J46 ( $p= 0.003$ ). En effet les valeurs du premier prélèvement se situent entre 444 et 361 unités alors que celles du J46 sont comprises entre 314 et 355 unités.

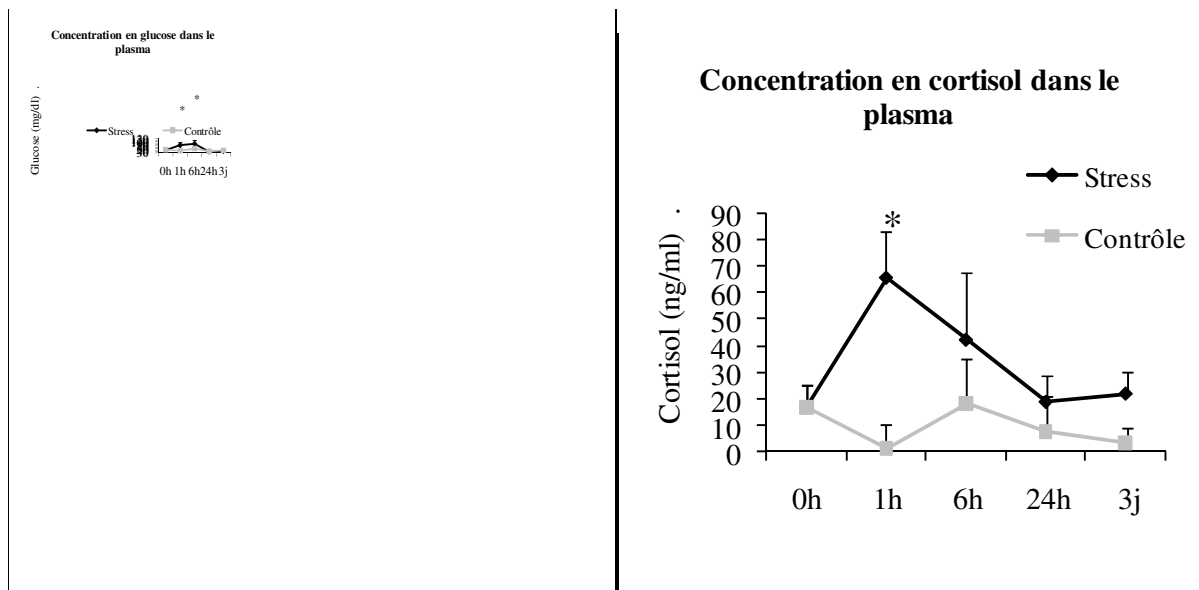
### **5. Quantité relative d'ARNm des récepteurs Glucocorticoïdes**

#### **a) De la rate**

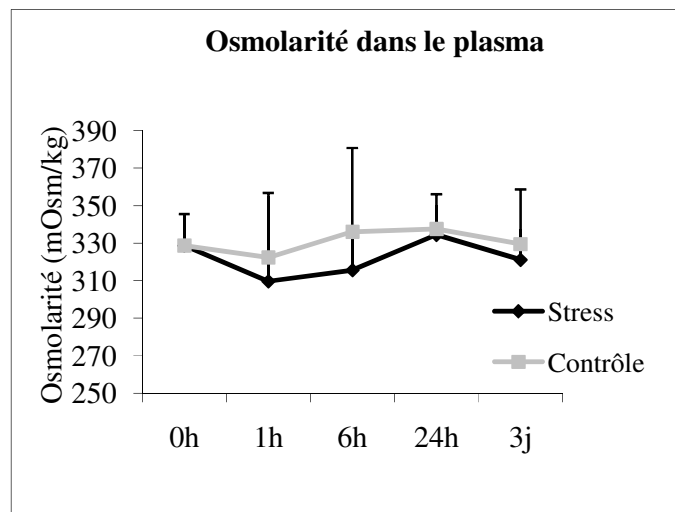
Aucun de nos facteurs d'études n'ont d'effets significatifs sur l'expression de ce gène, comme le montre la figure 11.

#### **b) Du foie**

Les résultats montrant les effets de l'interaction traitement/génération ( $p=0,026$ ) sur la quantité relative des ARNm des récepteurs glucocorticoïdes dans le foie sont représentés à la figure 12. Cet effet se remarque sur le niveau des contrôles de la génération F4 ( $p=0,006$ ). Ainsi, les contrôles de la génération F1 (31,2) sont supérieurs à ceux du groupe F4 dont la valeur relative est réduit de moitié (15,5).



**Figure 13 : Variations de la concentration en glucose (gauche) et du cortisol (droite) dans le plasma au long de l'expérience de stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 8 échantillons + écart type. \* : effets significatifs**



**Figure 14: Variations de l'osmolarité dans le plasma au long du stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 9 échantillons + écart type.**

## **Expérience 2 : Effet du stress aigu unique**

### **1. Dosage du glucose**

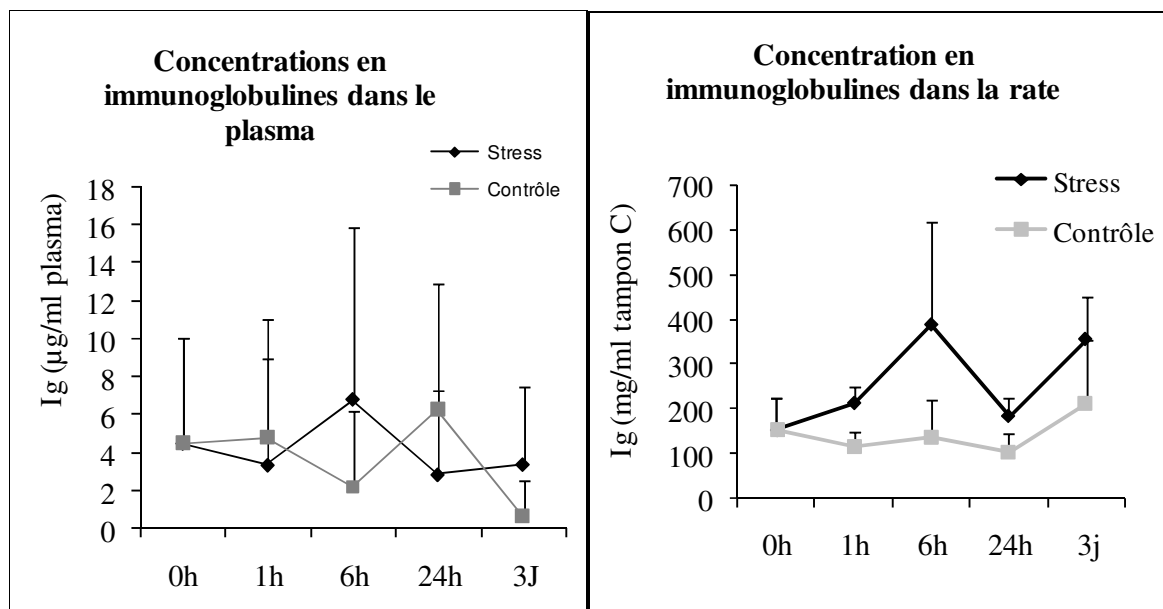
Un effet significatif du temps ( $p < 0,001$ ), du stress ( $p < 0,001$ ) et de leur interaction ( $p < 0,001$ ), est observé sur le glucose plasmatique (figure 13 droite). Ainsi les poissons stressés possèdent des valeurs en glucose 42,7 % plus élevées (67,8 mg/dl) que les poissons contrôles (47,51 mg/dl). Le profil des variations au cours du temps chez les poissons soumis au stress présente une rapide augmentation de 74% aux heures 1 et 6 (88,77 mg/dl) par rapport au premier prélèvement (51,02 mg/dl), ensuite vient une chute entre 6 et 24 heures (39,77 mg/dl) et enfin les concentrations reviennent au taux basal à partir de 24 heures. Le test statistique met également en évidence l'effet de l'interaction des 2 facteurs. En effet, seuls les poissons stressés présentent la variation au cours du temps décrite ci-dessus. Les contrôles quant à eux sont relativement stables avec uniquement une baisse significative entre le prélèvement de 6h (60,5 mg/dl) et de 24h (41,03 mg/dl).

### **2. Dosage du cortisol**

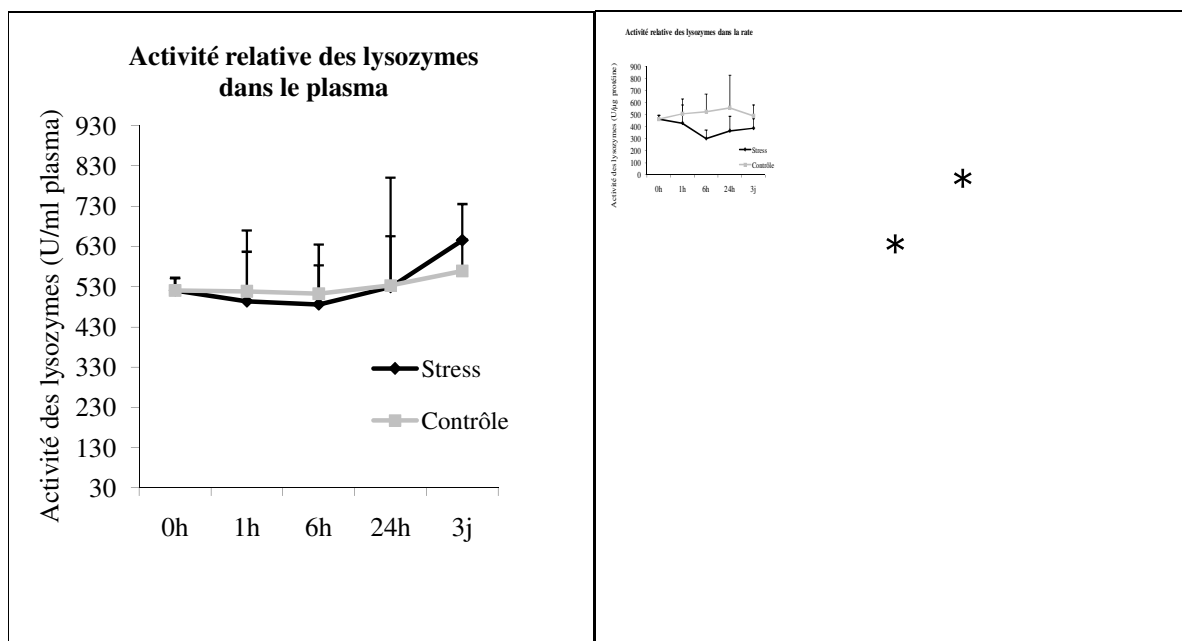
Les résultats montrant les variations du cortisol plasmatique au cours du stress aigu unique sont représentés à la figure 13 de droite. Le cortisol plasmatique augmente fortement suite au stress aigu unique ( $p < 0,001$ ). Les stressés (33,02 ng/ml) sont effectivement supérieurs aux contrôles (9,16 ng/ml) avec une hausse de 260,5 % en moyenne. Malgré qu'il n'y ait pas d'effet du temps, il est intéressant de connaître à quel prélèvement l'effet du stress se marque. Ainsi, uniquement à 1 heure, les poissons stressés présentent un taux de cortisol plus élevé que les contrôles ( $p < 0,001$ ). Leurs valeurs sont respectivement de 66 et 0,90 à 1 heure, soit 73 fois plus pour les stressés. Le pic visible pour les poissons stressés à 1h est bien significativement supérieur à toutes les autres conditions (excepté les poissons stressés à 6h).

### **3. Dosage de l'osmolarité**

Les facteurs d'intérêt n'influencent pas significativement l'osmolarité, comme le montre la figure 14. Les valeurs sont de l'ordre de 326,4 mOsm/kg.



**Figure 15:** Variations de la concentration en Immunoglobulines dans le plasma (gauche) et dans la rate (droite) au long de l'expérience de stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 8 échantillons (plasma) ou 4 échantillons (rate) + écart type.



**Figure 16 :** Variations de l'activité des lysozymes dans le plasma (gauche) et dans la rate (droite) au long du stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 10 échantillons + écart type. \* : effet significatif

#### **4. Dosage des Immunoglobulines**

- Dans le plasma

On ne peut déceler aucun effet significatifs des facteurs sur les variations de ce paramètre (figure 15 gauche).

- Dans la rate

Comme le montre la figure 15 droite, l'analyse statistique met en évidence un effet significatif de l'application du stress ( $p < 0,001$ ). En effet, Les stressés (257,67 mg/gr) sont significativement supérieurs aux contrôles (142,67 mg/gr). Quant au temps, il ne possède pas d'effet significatif ni seul ni pour son interaction avec le traitement. Cependant le test de l'interaction temps/traitement nous permet de déterminer que les poissons stressés ne sont différents des contrôles qu'au prélèvement de 6h ( $p = 0,001$ ).

#### **5. Dosage des lysozymes**

- Dans le plasma

Bien que le stress n'ait pas eu d'effet sur son activité, cette dernière varie significativement au cours du temps ( $p < 0,01$ ) (figure 16 gauche). En effet, elle augmente au dernier prélèvement avec 606,95 unités contre seulement 520,59 pour le premier prélèvement, soit une hausse de 16,6 %.

- Dans la rate

Comme le montre la figure 16 droite, cette activité ne présente qu'un effet du traitement. Ainsi, les contrôles (508,46 unités) sont en moyenne supérieurs de 30,4 % aux stressés (389,94 unités) ( $p = 0,002$ ). Cela se marque en particulier aux prélèvements 6 et 24 heure ( $p = 0,01$  et  $0,04$ ).

#### **6. Dosage de l'activité du complément**

Aucun effet sur l'activité du complément (figure 17) n'est attribuable aux facteurs testés.

#### **7. Dosage de la production de radicaux libres**

Seul un effet du temps ( $p = 0,04$ ) se dessine à la figure 18. Cet effet se marque au niveau du jour 3 pour lequel l'abondance d'anions superoxydes est plus forte (10 unité/gr) que pour tous les autres prélèvements (6,8 unité/gr) .

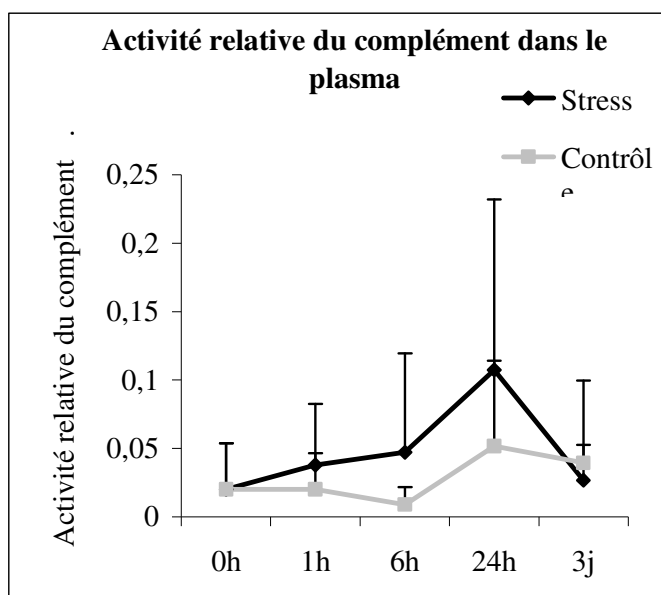


Figure 17 : Variations de l'activité relative du complément plasmatique au long du stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 8 échantillons + écart type.

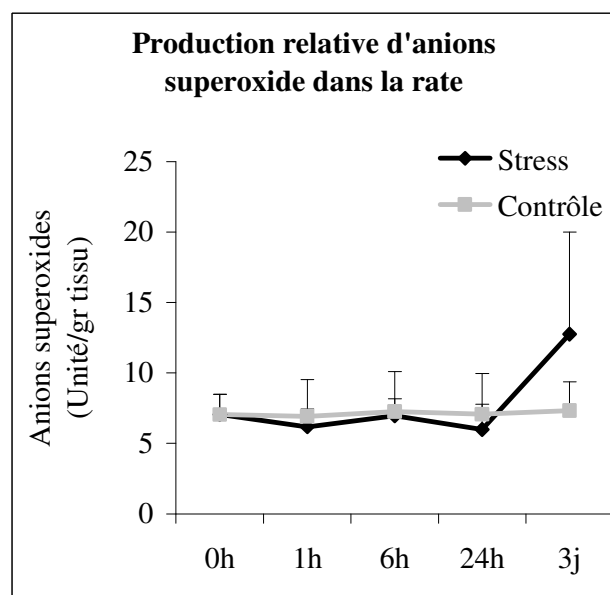


Figure 18 : Variations de la production de radicaux libres dans la rate au long du stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 6 échantillons + écart type.

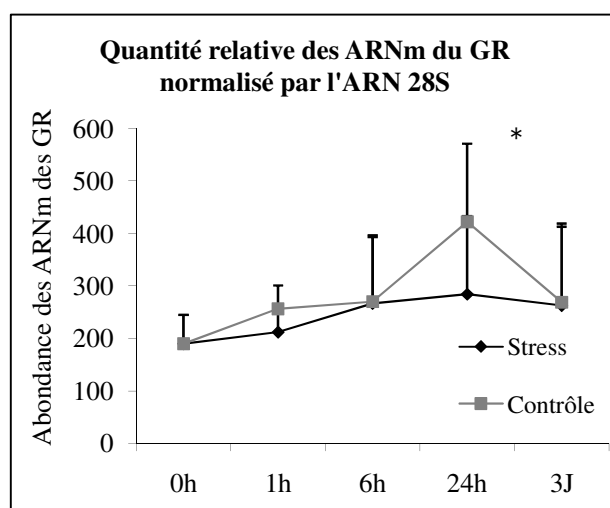


Figure 19: Variations de la quantité relative normalisée des ARNm des récepteurs glucocorticoïdes dans la rate au long de l'expérience de stress aigu unique. 0h à 3j : heures ou jour de prélèvements. Les points représentant les moyennes des concentrations de 6 échantillons + écart type. \* : effets significatifs

## **8. Dosage des ARNm des glucocorticoïdes dans la rate**

Comme le montre la figure 19, un effet du temps ( $p= 0,04$ ) et du traitement ( $p= 0,04$ ) est détecté sur l'expression de ce gène. Il se constate au niveau du prélèvement à 24h qui montre des plus fortes valeurs (353,3) que les prélèvements antérieurs (230,7). Plus précisément c'est le groupe des poissons contrôles à 24h qui présente des niveaux de transcrits significativement supérieurs à toutes les autres conditions. Les contrôles (193,3) présentent des valeurs supérieures aux stressés (167,1) tous temps confondus ( $p=0,04$ ).

## ***Expérience 3 : Effet du cortisol sur des cultures tissulaires de rates***

### **1. Dosage des Immunoglobulines**

Les analyses statistiques nous informent qu'aucune différence significative globale n'existe entre les traitements (figure 20). Cependant, une différence significative existe en comparant les groupes cortisol 100 ng (6,2 mg/gr) et RU 486 (8,36 mg/gr).

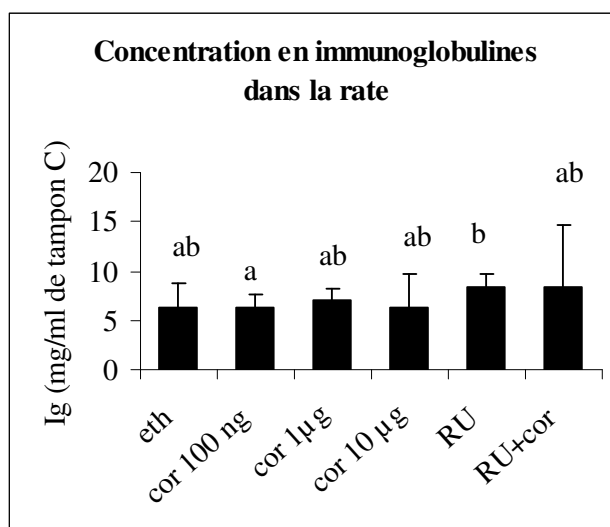
### **2. Dosage de l'activité des lysozymes et de la production de radicaux libres**

Aucune différence significative n'existe entre les traitements pour le dosage de l'activité des lysozymes (figure 21) ni pour la production de radicaux libres (figure 22).

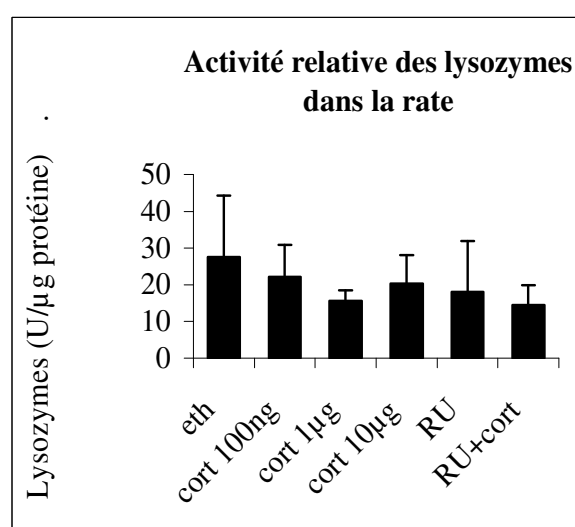
### **3. Dosage des ARNm des glucocorticoïdes**

Aucun effet global des traitement n'est significativement observé sur ce paramètre (figure 23). Cependant, les tests réalisés entre 2 conditions isolent les conditions cortisol 1 mg (435,04) et le RU 486 associé au cortisol (631,32) comme étant supérieures au contrôle éthanol (299,66).

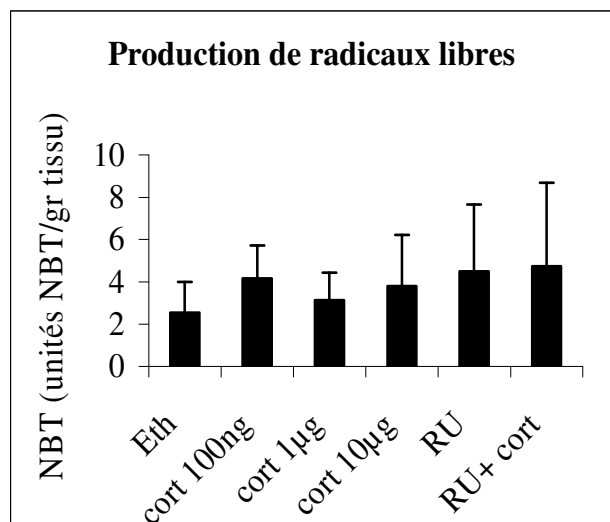




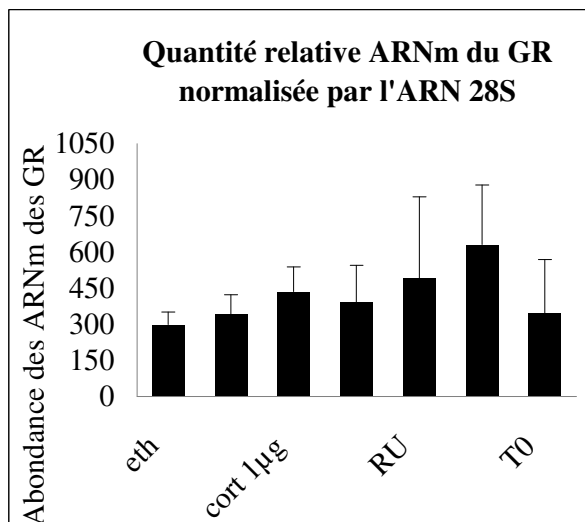
**Figure 20:** Variations de la concentration en Ig dans la rate selon les différents traitements de la culture *in vitro*. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 6 échantillons + écart type. a-b : différences significatives.



**Figure 21:** Variations de l'activité des lysozymes selon les différents traitements de la culture *in vitro*. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 6 échantillons + écart type.



**Figure 22:** Variations des radicaux libres selon les différents traitements de la culture *in vitro*. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 6 échantillons + écart type.



**Figure 23:** Variations de la quantité relative normalisée des ARNm des GR selon les différents traitements de la culture *in vitro*. Les histogrammes représentant les moyennes des concentrations de 6 échantillons + écart type. a-b : différences significatives. Le T0 correspond aux rates mises en contact avec le seul milieu de culture.

## **V. Discussion**

Pour rappel, l'objectif de ce mémoire est premièrement de caractériser les effets physiologiques et immunologiques d'un stress de manipulation, ensuite de vérifier si les effets du stress passent par le cortisol et le récepteur glucocorticoïde, et enfin de déterminer si la domestication module cette réponse.

L'application du stress aigu unique a induit des effets sur la physiologie du stress des perches.

Ainsi, les valeurs en glucose augmentent de 43 % et celles en cortisol de 260 % suite au stress unique.

Selon Acerete *et al.* (2007) et Lefèvre *et al.* (2008), la réponse à un stress aigu au niveau du cortisol peut subir une augmentation entre 30 et 300 ng/ml selon l'espèce considérée. Dans le cas de notre stress aigu unique, l'augmentation maximale de 50 ng/ml en cortisol se situe bien dans cette fourchette. Cette valeur est atteinte dès 1h et revient à la normale au bout de 24h. La rapidité de retour au taux basal du cortisol semble correcte à la vue des chiffres avancés par Acerete *et al.*, 2004 qui varient entre 14 jours pour un stress de transport et 4h pour un stress de manipulation chez la perche commune. On constate le même type de profil pour le glucose. Cela avait déjà été observé par Acerete *et al.* (2004) avec un pic de glucose à 1h et une baisse à 24 h pour un stress de manipulation chez la perche commune. Cependant, ses résultats sont plus bas et non significatives avec des valeurs maximales d'environ 59 mg/dl contre 89 mg/dl chez les perches de notre stress aigu unique (voir également Jentoft *et al.*, 2005). L'osmolarité, quant à elle, ne présente pas de variations significatives. Cependant, d'après la littérature, ce paramètre fait partie des indicateurs de stress chez les poissons au même titre que le cortisol et le glucose. Ainsi, la réponse attendue pour l'osmolarité en cas de stress est une diminution (Allanson *et al.*, 1971).

Pour notre stress aigu unique, le cortisol et le glucose sont donc de bons indicateurs de stress chez la perche, au contraire de l'osmolarité.

Par contre pour le stress répété, seul le glucose varie suite au stress. Le glucose présente plus souvent une variabilité de réponse selon le type de stress. En effet, un stress de confinement n'affecte pas le glucose chez la truite arc-en-ciel (Ruane *et al.*, 2000). Tandis qu'un stress de transport ou de manipulation chez la perche commune provoque une augmentation du glucose (Acerete *et al.*, 2004). L'absence d'effets du stress répété sur le cortisol, peut être dû au fait qu'il recouvre ces valeurs basales dans les 24 heures (Jentoft *et al.*, 2005). Or, ces mesures n'ont pas été faites dans ce délai pour le stress aigu répété. Nous considérerons qu'il est probable que l'information soit cachée par l'écart de temps trop long entre le stress et les prélèvements.

Les indicateurs usuels pour évaluer les réponses primaires et secondaires ne sont donc qu'en partie applicables lors d'un stress aigu de manipulation.

En plus de la modulation du cortisol et du glucose, le stress provoque les trois types de réaction possibles sur l'immunité selon le paramètre de l'immunité étudié.



Une diminution des lysozymes dans la rate est observée lors du stress aigu unique. Inversement, une augmentation des immunoglobulines est observée soit dans la rate pour le stress unique, soit dans le plasma pour le stress répété.

Enfin, la majorité des autres paramètres ne sont pas affectés. Celle-ci regroupe tous les paramètres immunitaires suite à l'application du stress aigu répété (à l'exception des Ig) et, en cas de stress unique, les immunoglobulines dans le plasma, l'activité des lysozymes, la production de radicaux libres et l'activité du complément. En conséquence, les effets d'un stress sur l'immunité sont dépendants de la nature du stress et du paramètre concerné.

Premièrement, les lysozymes affichent une diminution dans la rate en cas de stress de manipulation unique. Cependant, il n'est pas aisé de tirer des conclusions sur les lysozymes qui sont essentiellement étudiés dans le sang et présentent une forte hétérogénéité de réponse selon les espèces, les types de stress et les organes considérés (Lie *et al.*, 1989). Une première cause de variation se situe dans l'espèce étudiée. Ainsi, la truite montre une réponse après 10 minutes, le saumon réagit après 30 minutes tandis que d'autres espèces n'ont aucun changement significatif d'après Demers et Bayne (1997). Ensuite, des contradictions existent sur l'impact du stress sur l'activité des lysozymes. Ainsi, des augmentations ont été rapportées suite à un stress aigu dans le plasma (Moek & Peters, 1990) alors que des diminutions sont engendrées par des stress répété de densité (Yin *et al.*, 1995). Pourtant, Røed *et al.* (1993) constatent l'inverse avec une activité plus faible aux premiers instants de l'application d'un stress puis une augmentation lorsque celui-ci devient chronique (voir également Rotllant *et al.*, 1997). Ses observations concordent partiellement avec les nôtres. De plus, l'effet d'un stress aigu sur la chute du lysozyme dans la rate induit une efficacité moindre de l'activité de phagocytose et de l'action lytique sur les bactéries gram + dans cet organe.

Nous pouvons, grâce à ces observations, tirer un premier impact de nos stress sur l'immunité. Ainsi le stress répété n'affecte nullement l'immunité tandis que le stress unique provoque un impact délétère sur l'immunité innée.

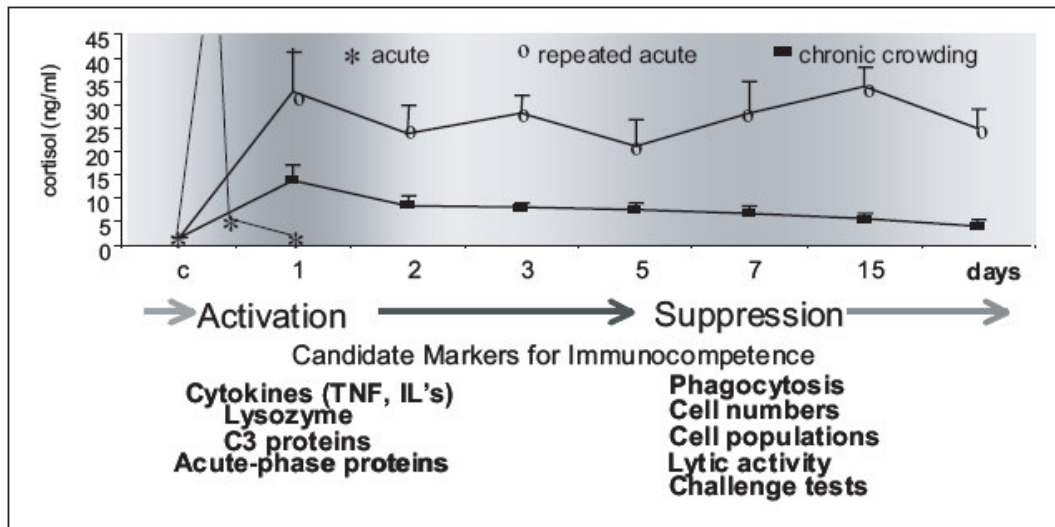
Deuxièmement, on observe une augmentation des immunoglobulines dans la rate (stress unique) et dans le plasma (stress répété). Généralement, les stress provoquent au contraire une déplétion des lymphocytes circulants qui produisent les immunoglobulines, avec pour conséquence directe du cortisol, une diminution des Ig plasmiques (Harris *et al.*, 2000 ; Ratan Saha *et al.*, 2003). Or, les immunoglobulines jouent un rôle important dans l'immunité acquise. Ainsi, plus d'Ig permettent une réaction plus rapide et plus forte de liaison d'un possible pathogène aux antigènes, d'activation du système du complément et de recrutement des cellules immunocompétentes.

On peut donc conclure que, dans ce deuxième type de réponse, un effet bénéfique du stress se marque sur l'immunité acquise et cela aussi bien en stress unique que répété.

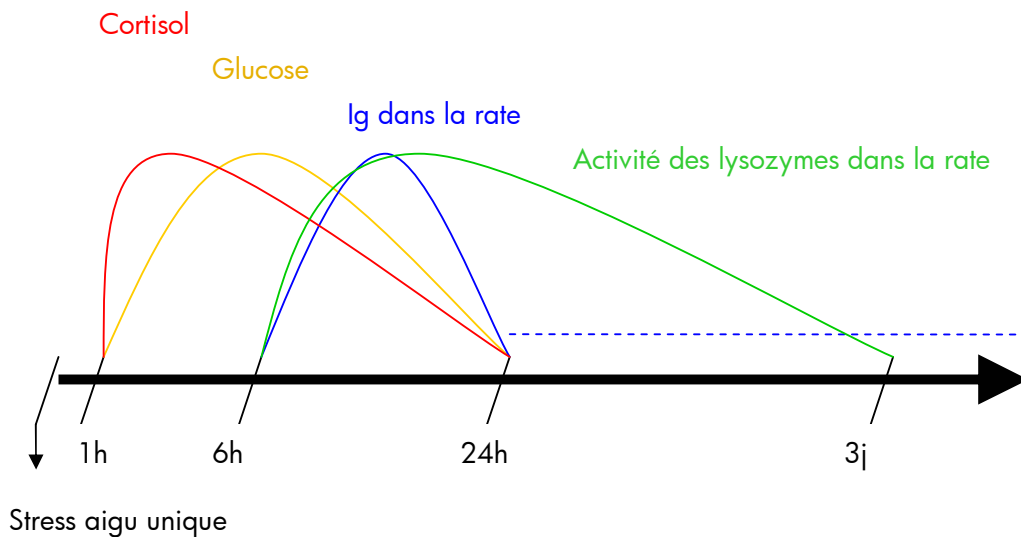
Troisièmement, de nombreux paramètres ne varient pas dans nos expériences. Ainsi à l'exception des Ig dans le plasma, le stress répété n'affecte aucun des paramètres de l'immunité testés. Quant au stress unique, les paramètres immunitaires qui varient dans la rate suite au stress, ne sont pas influencés dans le plasma par ce stress (Ig et activité des lysozymes). Le stress unique ne provoque pas non plus d'effets sur la production de radicaux libres et de l'activité du complément. Pourtant plusieurs études montrent que ce dernier diminue suite au stress. Par exemple, un stress aigu journalier (Sunyer *et al.*, 1995) ou de densité (Rotllant *et al.*, 1997) fait baisser l'activité du complément dès le premier jour post-stress. Il recouvre ensuite ses valeurs normales après 3 jours chez la daurade (Ortuño *et al.*, 2001) et après 14 jours chez la carpe commune (Yin *et al.*, 1995). Par contre, la constance des radicaux libres est en accord avec l'effet d'autres stress. En effet, les phagocytes qui produisent ces radicaux libres ne montrent pas d'augmentation suite à un stress de confinement (Vazzana *et al.*, 2002 ; Ortuño *et al.*, 2001) ni suite à un stress de densité (Yin *et al.*, 1995). Seule l'addition de cortisol provoque l'augmentation des radicaux libres. Celui-ci agit afin d'éviter cette réponse inflammatoire excessive en diminuant la production d'intermédiaires d'oxygène réactif et d'oxyde nitrique chez les leucocytes (Esteban *et al.*, 2004, Kawano *et al.*, 2003). Ces intermédiaires (ROI/RNI) visent à endommager l'ADN ou des groupes fonctionnels d'organismes néfastes (Saeij *et al.*, 2003 ; Hässig *et al.*, 1996). Leur augmentation est donc bénéfique seulement en cas d'attaque par un pathogène. En d'autres circonstances, la présence de radicaux libres peut altérer l'ADN des cellules du poisson. Il serait donc primordial que la production de radicaux libres soit maintenue constante suite à un stress, pour éviter des altérations délétères sur l'ADN de la perche. Au contraire, le peu de variation sur l'activité du complément, ainsi que ses valeurs basses, pourrait signaler que ce paramètre joue un rôle mineur dans l'immunité de la perche. Elle ne serait donc pas modifiée préférentiellement en cas de stress.

De même, suite à un stress, des mécanismes pourraient favoriser certains organes pour maintenir une partie de l'immunité. Il est alors intéressant de noter que 2 paramètres immunitaires sont constants dans le plasma tandis qu'ils varient dans la rate suite au stress (augmentation des Ig et diminution de l'activité des lysozymes). On pourrait imaginer que des mécanismes de redistribution cellulaire se mettent en place en cas de stress. Nos résultats illustreraient un effet en faveur du compartiment vasculaire pour l'activité des lysozymes. L'effet différentiel entre le plasma et la rate sur les Ig est cohérent avec les données de Rotllant *et al.* (1997) sur la baisse des lymphocytes qui survient, entre autre, suite à une redistribution vers le compartiment extravasculaire. L'étude des variations de ces 2 paramètres dans d'autres organes nous permettrait d'obtenir une vision plus globale de ces redistributions inter-organes.

Bien que le stress répété n'induisse qu'un très faible impact positif sur l'immunité, la présence des trois réponses au niveau des paramètres immunitaires ne nous permettent pas de vérifier si le stress induit des effets négatifs ou positifs sur l'immunité.



**Figure 24 :** Activation and suppression phases after stress, and candidate markers (Tort *et al.*, 2004)



**Figure 25 :** Cinétique des réponses physiologiques et immunitaires suite au stress aigu de manipulation unique (S. Lambert)

Les paramètres étudiés ne sont pas tous égaux dans leur réponse face au stress. De même leur rapidité de réponse après l'application du stress varie également. Premièrement, une rapide augmentation du cortisol et du glucose est présente, suivie d'un retour au taux basal après 24 heures (figure 24). Ce qui confirme que le cortisol est une des hormones qui peuvent faire augmenter la glycémie. Cette piste est également favorisée par l'augmentation de glucose (6h) suite au stress unique qui se fait plus tardivement que celle du cortisol (1h). Par contre le stress aigu répété ne permet pas d'appuyer cette hypothèse, en ne révélant pas d'effet du stress sur le cortisol mais bien sur le glucose. De plus, l'activité des lysozymes pourrait être régulée par le cortisol, produit suite au stress aigu unique, qui présente une hausse (à 1h) antérieure à la variation des lysozymes (à 6h). Enfin, l'augmentation des Ig pour les F4 stressés par rapport aux F4 contrôles au dernier prélèvement (46J) du stress répété se fait plus tardivement. Des plus fortes valeurs d'Ig sont aussi constatée en cas de stress unique dans la rate mais ici au prélèvement de 6h. Tort *et al.* (2004) observent que les leucocytes qui produisent les Ig sont affectés par le cortisol dans les heures qui suivent un stress.

On peut donc ainsi montrer une suite des effets du stress, du moins celui unique (Figure 25). Le cortisol est le premier à augmenter (1h). Ensuite un profil similaire, donc corrélé, se marque sur le glucose qui est décalé dans le temps (6h). Le premier paramètre de l'immunité innée qui varie est le lysozyme qui subit les effets du stress aussi rapidement que le glucose mais plus longtemps que celui-ci (jusqu'au jour 3). Et enfin l'immunité acquise est aussi atteinte à 6h. Cependant, le même effet, se marquant à 46J après le stress répété, nous fait penser que ce paramètre pourrait être modulé plus tardivement par le stress.

Malgré cela, la seule observation de la cinétique de variations de ces paramètres ne nous permet pas de conclure sur la régulation du lysosyme et des immunoglobulines par le cortisol. Notre hypothèse de départ que le cortisol est l'hormone par laquelle le stress influence les paramètres immunitaires en passant par son récepteur glucocorticoïde est réfutée par nos expériences in vitro. En effet, les paramètres qui varient suite au stress unique ne sont pas régulés in vitro par le cortisol. Par contre le cortisol semble bien provoquer un impact sur le récepteur glucocorticoïde en augmentant ses transcripts. Vijayan *et al.* (2003) constatent que l'injection de cortisol pour simuler un stress chronique fait augmenter l'abondance des ARNm des GR malgré une chute des protéines de ce même récepteur. Le même phénomène est observé in vitro sur les cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel avec une dose physiologique de cortisol (100 ng/ml). Il provoque une augmentation des transcrits de GR et une baisse leur protéine dans un délai de 24h (Sathiyaa & Vijayan, 2003). La baisse de protéines observée est due à une forte dégradation par les protéasomes des transcrits (Boone & Vijayan, 2002 ; Vijayan *et al.*, 2003 ; Sathiyaa & Vijayan, 2003). En effet, si on les bloque à l'aide d'inhibiteurs (lactacystin et MG-132), le cortisol n'induit plus de régulation



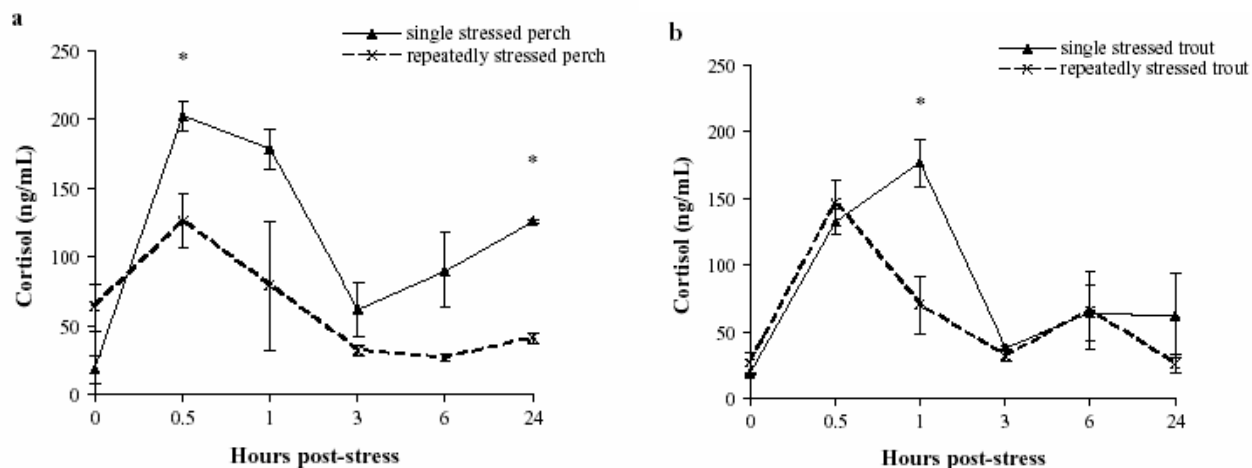
des GR (Sathiyaa & Vijayan, 2003). D'autres mécanismes de diminution de l'impact du cortisol peuvent se produire par l'augmentation du taux de dégradation de celui-ci ou encore par la diminution du nombre et/ou de l'affinité des récepteurs au cortisol (Takahashi et al., 2006 ; De Bosscher et al., 2008). Par conséquent, notre étude confirme l'autorégulation du GR par son propre ligand mais l'effet, visible au niveau des transcrits devra être confirmé au niveau des protéines. Par contre, l'absence de régulation du GR après le stress aigu, malgré la hausse de cortisol, est contradictoire avec nos constatations des tests *in vitro*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Des effets additionnels et opposés de plusieurs hormones du stress sur l'expression des GR peuvent être envisagés. Une autre piste est que le stress agirait comme facteur perturbateur de l'expression des 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases (11 $\beta$ -HSD), au contraire du cortisol seul. La 11 $\beta$ -HSD de type 2 est connue pour transformer le cortisol en cortisone inactive (Odermatt *et al.*, 2006). Or cette enzyme pourrait être inactivée par le stress et donc laisser le cortisol libre d'induire des effets. Les cultures tissulaires possèderaient au contraire l'enzyme sous sa forme active et donc le cortisol serait rapidement transformé.

Une information surprenante, que nous pouvons aussi tirer de ce dosage, est que le RU 486 ne semble pas bloquer l'action du cortisol sur son récepteur mais présente, au contraire, un effet agoniste sur l'expression de son gène. Or, cette molécule est connue dans la littérature pour agir comme antagoniste de ce récepteur. L'utilisation d'une dose très forte ( $10^{-5}$ M) pourrait expliquer ce résultat étonnant. En effet, Vizzini *et al.* (2007) constatent dans leur étude que le RU 486 se comporte comme un antagoniste du cortisol à de faible concentration ( $10^{-11}$ M) tandis qu'à de forte concentration ( $10^{-5}$ M), il agit au contraire comme un agoniste. Il serait donc intéressant de tester des doses plus faibles.

Nous pouvons donc certifier que le cortisol augmente en cas de stress mais n'agit pas, ou du moins pas seul, pour engendrer d'autres effets sur l'immunité.

Un facteur intéressant pour atténuer les effets observés du stress pourraient être la domestication. Pourtant celle-ci est très peu marquée sur les paramètres physiologiques et immunologiques testés. Rappelons que les réponses au stress des générations F1 et F4 sont testées uniquement suite au stress aigu répété. Seul deux paramètres sont influencés par la génération, le cortisol et l'abondance des ARNm des GR. Ainsi au dernier prélèvement, les poissons stressés montrent des valeurs en cortisol 2 fois plus élevées lorsque qu'il appartiennent à la génération F1 que lorsqu'ils sont de la génération F4. Cela pourrait témoigner d'une plus forte sensibilité au stress aigu pour les poissons les moins domestiqués. La moyenne des

valeurs en cortisol au temps 0, est seulement de 11 ng/ml pour les expériences de stress aigu unique et répété.



**Figure 26 :** Post-stress serum cortisol levels (ng/mL) in single stressed and repeatedly stressed fish of Eurasian perch (a) and rainbow trout (b) during a 24-h period. Data represent  $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ ,  $n=3$  (each replicate contained pooled blood samples from three individuals from each tank). Means labeled \* are different at  $P < 0.05$ .

(Jentoft *et al.*, 2005)

Cette valeur est plus basse que celle prévue par Acerete *et al.* (2004) qui estiment que *Perca fluviatilis* possède un taux basal de cortisol élevé, d'environ 45 ng/ml en raison de son faible degré d'adaptation aux conditions d'élevage. La lignée de perche commune que nous utilisons s'est donc acclimatée aux conditions aquacoles au vue des niveaux de cortisol mesurés qui sont proches de ceux de poissons domestiqués comme la truite arc-en-ciel et la carpe (1.7 et 7.4 ng/ml) (Barton, 2002). Cela confirme les observations de Jentoft *et al.* (2005). En effet, ce scientifique montre que la truite (domestiquée) et la perche (non domestiquée) présentent le même profil de cortisol avec un pic après 0.5-1h et des valeurs très similaires ( $177 \pm 18$  et  $202 \pm 11$  ng/ml) suite à un stress unique de manipulation (Figure 26).

Un autre paramètre qui varie selon la domestication est l'abondance relative des ARNm des récepteurs glucocorticoïdes dans le foie. Tous prélèvements confondus, les contrôles de la génération F1 montrent des valeurs plus élevées que ceux de la génération F4. Etant donné qu'il n'y a pas de différence significative en cas de stress, on ne peut que conclure que l'expression basale du gène est plus fort pour les poissons moins domestiqués. Cela montre que le processus de domestication provoque une plus faible réceptivité au cortisol et confirme que la domestication influe sur la voie de transduction des glucocorticoïdes (effet sur cortisol et GR). En tout cas, nos résultats suggèrent que la domestication n'est pas un facteur influençant les paramètres de l'immunité chez la perche, en vue, par exemple, de diminuer des effets délétères de stress en aquaculture.

## **VI. Conclusion et perspectives**

Premièrement, nous tentions de caractériser les effets physiologiques et immunologiques d'un stress de manipulation. Les paramètres qui ne varient pas, ni en cas de stress répété ni en cas de stress unique, sont l'osmolarité, la production de radicaux libres et l'activité du complément. Par contre, les effets significatifs du stress que l'on peut observer dans nos expériences ne sont pas toujours similaires pour le stress unique ou celui répété.

Ainsi, lorsque ce stress est unique, il provoque une rapide augmentation du taux de cortisol. Ensuite celui-ci induit une glycémie plus élevée. Ces deux paramètres recouvrent leur taux basal dans les 24h.

L'immunité est aussi affectée pour les concentrations en immunoglobulines et l'activité des lysozymes au niveau de la rate. Le stress engendre une augmentation des Ig qui pourrait être bénéfique. Tandis que la diminution rencontrée sur l'activité des lysozymes semble plutôt néfaste.

Lorsque le stress est répété, les paramètres semblent moins perturbés. Le cortisol ne varie qu'au dernier prélèvement pour la génération F4 avec des valeurs plus fortes pour les stressés. On remarque par contre une glycémie élevée pour les poissons stressés tout au long de cette expérience. Le peu d'effets observés sur le cortisol pourrait être causé par un délai de 24h trop long entre le stress et le prélèvement. Cependant le manque d'effets sur l'immunité, indique plutôt que le stress répété de manipulation n'est que faiblement perçu par les perches, bien qu'on constate tout de même une augmentation des Ig plasmatiques.

Ensuite, nous tentions de vérifier si les effets du stress passent par le cortisol et le récepteur glucocorticoïde (GR). Les effets du stress visibles *in vivo* sur certains paramètres sont absents *in vitro* et ne sont donc pas attribuables au cortisol. Par contre, une concentration supra-physiologique de cortisol agit sur l'abondance relative des GR par régulation positive directe. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de conclure si le récepteur est présent en quantité plus élevée dans la rate. Une étude sans a priori grâce à une approche protéomique permettrait d'identifier les protéines sur- ou sous-exprimées en cas de stress, quelles appartiennent à l'immunité, à la voie de transduction du GR ou à d'autres cascades physiologiques.

Enfin, nous voulions déterminer si la domestication module la réponse au stress des paramètres étudiés (physiologiques et immunitaires). Il semble que l'écart entre les générations F1 et F4 ne soit pas suffisant pour marquer une forte modulation par la domestication. Seul le cortisol et son récepteur subissent des impacts de la domestication.

Pour ces 2 paramètres, la génération F1 présente des valeurs plus élevées que la génération F4. Le cortisol étant un bon indicateur de stress comme nous l'avons montré *in vivo*, il semble bien que la domestication permette de présenter des effets moindres face au stress de manipulation. L'immunité, quant à elle, ne bénéficie pas de cette action.

De nombreuses pistes sont encore à explorer dans le cadre de cette étude. Les paramètres dans le foie pourraient être intéressants à investiguer ainsi que dans d'autres organes. De même, un écart plus fort de génération pourrait être utilisé pour évaluer l'effet de la domestication sur les paramètres immunitaires en cas de stress. De nombreux paramètres restent à étudier tels que les Hsp, les quantités de leucocytes, le système reproducteur,... qui pourraient tous être influencés par le stress. Le cortisol ne semblant pas être le seul acteur du stress, il serait également judicieux de doser d'autres hormones ainsi que l'autre grande classe de récepteurs aux corticostéroïdes, les récepteurs minéralocorticoïdes. Une autre recommandation concernant le stress aigu répété serait d'obtenir un état de stress suffisant pour que le taux de cortisol reste constamment élevé. Cela pourrait être obtenu en stressant les poissons toutes les 12-24h plutôt que toutes les 48h.

## **VII. Annexes**

## 1. Lexique des abréviations

11 $\beta$ -HSD : 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase

ACTH: Adreno CorticoTropic Hormone

CREB: cAMP responsive element binding protein

CRF: corticotropin-releasing-factor

EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration

ED<sub>50</sub>: effective dose in 50% of cases

GR : récepteurs glucocorticoïdes

GRE : Glucocorticoids-Responsive-Elements

GSH: glutathion

HPI : hypothalamus-pituitary-interrenal

HSP: Heat Shock Protein

IL-1 : interleukines-1

LPS : lipopolysaccharide

MR : récepteurs minéralocorticoïdes

NF- $\kappa$ B: nuclear factor-kappa

NPO : noyau hypothalamique preoptique

RNI : intermédiaires de nitrogène réactif

ROI : intermédiaires d'oxygène réactif

TNF- $\alpha$  : facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale

UI : urotensine

## 2. Annexes statistiques

### Expérience 1 : Effet du stress aigu répété

#### 1. Dosage du glucose

Résultats généraux :

	J0	J10	J20	J46
F1 contrôle	61,2 +- 11	58,8 +- 11,3	50,2 +- 13,1	40 +- 7,2
F4 contrôle	61,8 +- 24,4	47,9 +- 3,1	60,3 +- 5,2	47,7 +- 5,3
F1 stress	57,9 +- 27	59,9 +- 8,8	75 +- 25,8	48,4 +- 6,3
F4 stress	73,8 +- 15,8	56,8 +- 1,8	74,4 +- 12,6	46,8 +- 6

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
GLU	119,811211	0,31134284	12,15048218	11	0,35248303

Normalité :

VAR5 (new.sta)	
K-S d=,11901; p> .20; Lilliefors p> .20	

#### 2. Dosage du cortisol

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
CORT	41,1	0,21	8,82	11	0,64

Normalité :

VAR5 (new.sta)			
K-S d=,05162; p> .20; Lilliefors p> .20			

#### 3. Dosage des Immunoglobulines dans le sang

Homoscédasticité:

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
IG	6,06327915	0,2257171	16,6972656	11	0,11721852

Normalité:

VAR4 (new.sta)		
K-S d=,08265; p> .20; Lilliefors p<,05		

#### 4. Dosage de l'activité des lysozymes

Résultats généraux:

	J10	J20	J46
--	-----	-----	-----



F1 contrôle	361,4 +- 13	366,4 +- 47,3	324,9 +- 40,9
F1 stress	444,3 +- 40,9	350,4 +- 17,9	354,8 +- 56
F4 contrôle	374,3 +- 11,9	371,3 +- 71	334,7 +- 20
F4 stress	369,5 +- 67,2	345,1 +- 24,4	314,5 +- 31,6

Homoscédasticité :

Tests of Homogeneity of Variances (explsof.sta)					
	Hartley	Cochran	Bartlett		
	F-max	C	Chi-sqr	df	p
LYS	35,6901665	0,24125205	11,6520948	11	0,39039171

Normalité :

LYS (new.sta)	
K-S d=,09837; p> .20; Lilliefors p> .20	

## 5. Quantité relative d'ARNm des récepteurs Glucocorticoïdes

Dans la rate :

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances (new.sta)					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
VAR5	23,1059818	0,33478737	21,2877636	11	0,03054839

Normalité :

GR (new.sta)	
K-S d=,14664; p<,20 ; Lilliefors p<,01	

Dans le foie :

Résultats généraux :

	J0	J10	J20	J46
F1 Contrôle	18,6 +- 13,3	40,8 +- 56,1	34,4 +- 34	31,2 +- 11,9
F1 Stress	10,2 +- 3,5	35,1 +- 27,7	19,8 +- 20,6	14,2 +- 10,9
F4 Contrôle	17,1 +- 6,9	15,4 +- 14,2	7,3 +- 10,1	22,2 +- 17,6
F4 Stress	25,7 +- 2,7	13,5 +- 10,7	23 +- 15,7	38,8 +- 19

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
GR	531,2699585	0,2880637	17,72372627	11	0,08827655

Normalité :

GR		
K-S d=,08463; p> .20; Lilliefors p> .20		

## Expérience 2 : Effet du stress aigu unique

### 1. Dosage du glucose

Homoscédasticité :

Tests of Homogeneity of Variances (explsof.sta)					
	Hartley	Cochran	Bartlett		
	F-max	C	Chi-sqr	df	p
GLU	7,21454906	0,203556791	9,420393944	9	0,399438173

Normalité :

VAR4 (new.sta)	
K-S d=,11810; p> .20; Lilliefors p<,10	

## 2. Dosage du cortisol

Homoscédasticité :

Tests of Homogeneity of Variances (explsof.sta)					
	Hartley	Cochran	Bartlett		
	F-max	C	Chi-sqr	df	p
COR	29,2933712	0,20429075	8,59924889	9	0,47507861

Normalité :

VAR4 (new.sta)	
K-S d=,09769; p> .20; Lilliefors p> .20	

## 3. Dosage de l'osmolarité:

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances (new.sta)					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
OSM	22,3050117	0,41419533	40,134388	9	<b>7,2466E-06</b>

Normalité :

OSM (new.sta)	
K-S d=,18861; <b>p&lt;,01</b> ; Lilliefors p<,01	

## 4. Dosage des IgG

- Dans la plasma

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances (new.sta)					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
VAR5	3,569493532	0,1492109	3,732916117	8	0,880369961

Normalité :

VAR5 (new.sta)	
K-S d=,24418; <b>p&lt;,01</b> ; Lilliefors p<,01	

- Dans la rate

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
IG	16,188	0,2772	8,1704	7	0,3178

Normalité :

Log Ig (new.sta)	
K-S d=,06951; p> .20; Lilliefors p> .20	

#### 5. Dosage des lysozymes

- Dans le sang

Homoscédasticité:

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
LYS	3,5614531	0,24932624	8,14109516	7	0,32035124

Normalité:

LYS (new.sta)		
K-S d=,08248; p> .20; Lilliefors p<,10		

- Dans la rate

Homoscédasticité:

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
TRAIT	14,7890062	0,43892977	11,0382671	7	0,13700347

Normalité:

LYS (new.sta)	
K-S d=,09645; p> .20; Lilliefors p> .20	

#### 6. Dosage de l'activité du complément

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
COMP	8,3737936	0,27834815	8,04548454	7	0,3286337

Normalité :

VAR4 (new.sta)	
K-S d=,07680; p> .20; Lilliefors p> .20	

#### 7. Dosage des radicaux libres

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances (new.sta)					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
NBT	19,614	0,2631	11,735	7	0,1097

Normalité :

VAR4 (new.sta)	
K-S d=,11263; p> .20; Lilliefors p<,10	

#### 8. Dosage de l'osmolarité

Homoscédasticité:

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
OSM	15,0648098	0,28666377	28,2338505	7	<b>0,00020029</b>

Normalité:

K-S d=,16639; **p<,05** ; Lilliefors p<,01

#### 9. Dosage des ARNm des glucocorticoïdes dans la rate

Homoscédasticité :

Tests d'Homogénéité des Variances					
	F-max	C de	Chi² de		
	Hartley	Cochran	Bartlett	dl	p
GR	11,1259041	0,25266543	8,72179985	7	0,27329025

Normalité :

GR (new.sta)	
K-S d=,07063; p> .20; Lilliefors p> .20	

### Expérience 3 : Effet du cortisol sur des cultures tissulaires de rates

#### 1. Dosage des IgG

Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (exp1sof.sta)	
Independent (grouping) variable: TRAIT	
Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 35) = 6,966992 p =,3239	

Mann-Whitney :

Mann-Whitney U Test										
<b>Group 1: 121-cor 100m Group 2: 124-RU</b>										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	cor 100m	RU	U	Z	p-level	adjusted	p-level	cor 100m	RU	exact p
IG	24	54	3	-2,402	<b>0,016</b>	-2,4019	0,016	6	6	0,015152

#### 2. Dosage des lysozymes

Kruskal-Wallis

lys/prot tot			
Kruskal-Wallis test: H ( 5, N= 33) = 5,490913 p =,3590			

#### 3. Dosage des radicaux libres produits

Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (osmolarité stressaigu.sta)		
Independent (grouping) variable: TRAIT		
Kruskal-Wallis test: H ( 5, N= 36) = 3,201198 p =,6690		

#### 4. Dosage des ARNm des glucocorticoïdes

# Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (exp1sof.sta)	
Independent (grouping) variable: TRAIT	
Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 36) = 9,010513 p =,1730	

Mann-Whitney 2à2

Mann-Whitney U Test										
<b>Group 1: 104-Eth Group 2: 106-cort 1mg</b>										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Eth	cort 1mg	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Eth	cort 1mg	exact p
GR	25	53	4	-2,242	0,025	-2,242	0,025	6	6	0,026

Mann-Whitney U Test										
<b>Group 1: 104-Eth Group 2: 109-RU+ cort</b>										
	Rank Sum	Rank Sum				Z		Valid N	Valid N	2*1sided
	Eth	RU+ cort	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Eth	RU+ cort	exact p
GR	22	56	1	-2,722	0,006	-2,722	0,006	6	6	0,004

## **VIII. Références bibliographiques**

1	Acerete L. , Balasch J.C., Castellana B., Redruello B., Roher N., Canario A.V., Planas J.V., MacKenzie S. & Tort L., Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream ( <i>Sparus aurata</i> ) Differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge, <i>Comparative Biochemistry and Physiology</i> , 2007, Part B vol.148, pp 32-43.
2	Acerete L., Balash J.C., Espinosa E., Josa A. & Tort L., Physiological responses in Eurasian perch ( <i>perca fluviatilis</i> , L.) subjected to stress by transport and handling, <i>Aquaculture</i> , 2004, vol. 237, pp 167-178.
3	Alexander J.B. & Ingram G.A., Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish, <i>Annual Review of Fish Diseases</i> , 1992, vol.2, pp 249-279.
4	Allanson B.R, Bok A. & Van Wyk N.I.,The influence of exposure to low temperature on Tilapia mossambica Peters (Cichlidae), <i>Journal of Fish Biology</i> , 1971, vol. 3(2), pp 181 – 185.
5	Bamberger C. M., Schulte H. M. & Chrousos G. P., Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids, <i>Endocrine Reviews</i> , 1996, vol.17, pp 245-261.
6	Barton B.A., Stress in fishes : a diversity with particular reference in changes in circulating corticosteroids, <i>Integrative and Comparative Biology</i> , 2002, vol. 42, pp 517-525.
7	Beato M., Herrlich P. & Schutz G., Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot., <i>Cell</i> , 1995, vol.83(6), pp 851-857.
8	Bernier N.J. & Peter R. E., The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish, <i>Comparative Biochemistry and Physiology</i> , 2001, Part B vol.129, pp 639-644.
9	Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C. & Lee L.E.J., Ecotoxicology and innate immunity in fish, <i>Developmental and Comparative Immunology</i> , 2001, vol.25, pp 853-873.
10	Boone A.N. & Vijayan M.M., Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hépatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure, <i>Comparative Biochemistry and Physiology</i> , 2002, Part C vol.132, pp 223-233.
11	Boshra H., Li J. & Sunyer J.O., Recent advances on the complement system of teleost fish, <i>Fish &amp; Shellfish Immunology</i> , 2006, vol.20, pp 239-262.
12	Branson E.J., Fish welfare, Ed. Blackwell Publishing, Singapore, 2008, 300 pages.
13	Bury N.R. & Sturm A., Evolution of corticosteroid receptor signalling pathway in fish, <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 2007, vol. 153, pp 47-56.
14	Calvino B., Introduction à la physiologie, Ed. Belin, Paris, 2003, 222 pages.
15	Colombe L., Fostiera A., Burya N., Pakdelb F. & Guiguen Y., A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> : cloning and characterization of its steroid binding domain, <i>Steroids</i> , 2000, vol.65, pp 319-328.
16	De Bosscher K., Van Craenenbroeck K., Meijerb O.C. & Haegeman G., Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems, <i>European Journal of Pharmacology</i> , 2008, vol.583, pp 290-302.
17	Demers N.E. & Bayne C.J., The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout, <i>Developmental and Comparative Immunology</i> , 1997, vol.21, No.4, pp 363-373.

18	Doyon C., Leclair J., Trudeau V.L. & Moon T.W., Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are modified by glucocorticoids in rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> , General and Comparative Endocrinology, 2006, vol.146, pp 126-135.
19	Eckert R., Physiologie animale, mécanismes et adaptation, Ed. de Boeck, Bruxelles, 1999, pp 287-292; 328-330.
20	Engelsma M.Y., Huising M.O., van Muiswinkel W.B., Flik G., Kwang J., Savelkoul H.F.J. & Verburg-van Kemenade B.M.L., Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1, Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, vol.87, pp 467-479.
21	Espelid S., Løkken G.B., Steiro K. & Bøgwald J., Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> L.), Fish & Shellfish Immunology, 1996, vol.6, pp 95-110.
22	Esteban A., Rodriguez A., Ayala A.G. & Meseguer J., Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream ( <i>Sparus aurata</i> L.), General and Comparative Endocrinology, 2007, vol.137, pp 89-98.
23	Fast M.D., Hosoya S., Johnson S.C. & Afonso L.O.B., Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> Linnaeus) subjected to short- and long-term stress, Fish & Shellfish Immunology, 2008, vol.24, pp 194-204.
24	Fevolden S.-E., Røed K. H. & Fjalestad K. T., Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth, Aquaculture, 2002, vol.205, pp 61-75.
25	Fevolden S.-E. & Røed K. H., Cortisol and immune characteristics in rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) selected for high or low tolerance to stress, Journal of Fish Biology, 1993, vol.43, pp 919-930.
26	Fevolden S.-E., Røed K. H. , Fjalestad K. T. & Stien J., Poststress levels of lysozyme and cortisol in adult rainbow trout: heritabilities and genetic correlations, Journal of Fish Biology, 1999, vol.54, pp 900-910.
27	Flik G., Klaren P.H.M., Van den Burg E.H., Metz J.R. & Huising M.O., CRF and stress in fish, General and Comparative Endocrinology, 2006, vol.146, pp 36-44.
28	Fontaine P., L'élevage de la perche commune, une voie de diversification pour l'aquaculture continentale, INRA Production Animale, 2004, vol.17 (3), pp 189-193.
29	Garcia-Castillo J., Pelegrín P., Mulero V. & Meseguer J., Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature, Immunogenetics, 2002, vol.54, No 3, pp 200-207.
30	Gilles R., Physiologie animale, Ed. de Boeck, Bruxelles, 2006, pp 534-555.
31	Hagen I.J., Kusakabe M. & Young G., Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11 B-hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: Relationship with in vitro cortisol production, General and Comparative Endocrinology, 2006, vol.145, pp 254-262.
32	Harris J. & Bird D.J., Modulation of the fish immune system by hormones, Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000, vol.77, pp 163-176.
33	Hässig A., Wen-Xi L. & Stampfli K., Stress-induced suppression of the cellular immune reactions: on the neuroendocrine control of the immune system, Medical Hypotheses, 1996, vol.46, pp 551-555.
34	Henderson I.W. & Kime D.E., The adrenal cortical steroids, Physiol. Rev., 1991, vol.89



35	Hosoya S., Johnson S.C., Iwama G.K., Gamperl A.K. & Afonso L.O.B., Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock ( <i>Melanogrammus aeglefinus</i> ) exposed to long-term handling stress, Comparative Biochemistry and Physiology, 2007, Part A vol.146, pp 78-86.
36	Iwama G.K., Pickering A.D., Sumpter J.P. & Schreck C.B., Fish stress and health in aquaculture, Ed. Cambridge university, Cambridge, 1997, 278 pages.
37	Jentoft S., Aastveit A.H., Trojesen P.A. & Andersen Ø, Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch ( <i>perca fluviatilis</i> ) and domesticated rainbow trout ( <i>oncorhynchus mykiss</i> ), Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, Part A vol.141, pp 353-358.
38	Kawano H., Kono T., Watanuki H., Savan R. & Sakai M., Analysis of genes expressed in head kidney of common carp <i>Cyprinus carpio</i> L. treated with cortisol, Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, Part B vol.136, pp 875-886.
39	Kloet de E.R., Katst H. & Joëls M., Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow, Frontiers in Neuroendocrinology, 2008, vol.29, pp 268-272.
40	Köllner B., Wasserrab B., Kotterba G. & Fischer U., Evaluation of immune functions of rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )-how can environmental influences be detected?, Toxicology Letters, 2002, vol.131, pp 83-95.
41	Lefèvre F., Bugein J., Aupérin B. & Aubin J., Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality, Aquaculture, 2008, vol. 284, pp 81-89.
42	Lepage O., Overli O., Petersson E., Järvi T. & Winberg S., Differential stress coping in wild and domesticated sea trout, Brain Behavior and Evolution, 2000, vol.56(5), pp 259-68.
43	Lie Ø., Evensen Ø., Sørensen A. & Frøysadal E., Study on lysozyme activity in some fish species, Diseases of Aquatic Organisms, 1989, Vol. 6, pp 1-5.
44	Magnadóttir B., Innate immunity of fish, Fish & Shellfish Immunology, 2006, vol.20, pp 137-151.
45	Maule A.G. & Schreck C.B., Changes in Numbers of Leukocytes in Immune Organs of Juvenile Coho Salmon after Acute Stress or Cortisol Treatment, Journal of Aquatic Animal Health, 1990, vol.2, pp 298-304.
46	Maule A.G. & Schreck C.B., Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon, General and Comparative Endocrinology, 1991, vol.84(1), pp 83-93.
47	Mazon A.F., Nolan D.T., Lock R.A.C., Fernandes M.N. & Wendelaar Bonga S.E., A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum), Toxicology in Vitro, 2004, vol.18, pp 691-701.
48	Milla S., Terrien X., Sturm A., Ibrahim F., Giton F., Fiet J., Prunet P. & Le Gac F., Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> spermiation: implication with 17alpha, 20beta-dihydroxyprogesterone on the milt fluidity?, Reproductive Biology and Endocrinology, 2008, pp 6-19 .
49	Odermatt A., Gumya C., Atanasova A.G. & Dzyakanchuk A.A., Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006, vol. 102 (1-5), pp 222-231.
50	Pottinger T.G., Context dependent differences in growth of two rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) lines selected for divergent stress responsiveness, Aquaculture, 2006, vol.256, pp 140-147.

51	Prunet P., Sturm A. & Milla S., Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts, <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 2006, vol.147, pp 17-23.
52	Pulsford A.L., Lemaire-Gony & Faley S., Effects of acute stress on the immune system of the dab, <i>Limanda limanda</i> , <i>Comparative Biochemistry and Physiology, Part C</i> vol.109, No. 2, pp. 129-139, 1994.
53	Ratan Saha N., Usami T. & Suzuki Y., In vitro effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ), <i>Fish &amp; Shellfish Immunology</i> , 2004, vol.17, pp 149-158.
54	Roberts R.J., <i>Pathologie du poisson</i> , ed. maloine s.a., Paris, 1979, 317 pages.
55	Rød K. H., Larsen H.J., Linder R.D. & Refstie T., Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> ), <i>Aquaculture</i> , 1993, vol. 109, pp 237-244.
56	Rød K. H. , Fevolden S. -E. & Fjalestad K. T., Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) selected for lysozyme activity, <i>Aquaculture</i> , 2002, vol.209, pp 91-101.
57	Rotllant J., Pavlidis M., Kentouri M., Abad M.E. & Tort L., Non-specific immune responses in the red porgy <i>Pagrus pagrus</i> after crowding stress, <i>Aquaculture</i> , 1997, vol.156, pp 279-290.
58	Rouger Y., Aubin J., Breton B., Fauconneau B., Fostier A., Le Bail P. Y., Loir M., Prunet P. & Maisse G., Réponse au stress induit par le transport chez la truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ), <i>Bulletin français de la pêche et de la pisciculture</i> , 1998, vol. 71, No 350-51, pp 511-519.
59	Ruane N.M., Nolan D.T., Rotllant J., Costellae J. & Wendelaar Bonga S.E., Experimental exposure of rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum) to the infective stages of the sea louse <i>Lepeophtheirus salmonis</i> (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor, <i>Fish &amp; Shellfish Immunology</i> , 2000, vol.10, pp 451-463.
60	Saeij J.P.J., Verburg-van Kemenade L.B.M., van Muiswinkel W.B. & Wiegertjes G.F., Daily handling stress reduces resistance of carp to trypanoplasma borreli: in vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis, <i>Developmental and Comparative Immunology</i> , 2003, vol.27, pp 233-245
61	Sathiyaa R. & Vijayan M.M., Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes, <i>American Journal physiology-Cell Physiology</i> , 2003, vol.284, pp C1508-C1515.
62	Scherrer L.C., Dalman F.C., Massa E., Meshinchi S. & Pratt W.B., Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex, ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> ), <i>Journal of Biology and Chemistry</i> , 1990, vol.265, pp 21397-21400.
63	Stolte E.H., Verburg-van Kemenade B.M.L., Savelkoul H.F.J. & Flik G., Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity, <i>Journal of Endocrinology</i> , 2006, vol.190, pp 17-28.
64	Sunyer J.O., Gomez E., Navarro V., Quesada J. & Tort L., Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead seabream ( <i>Sparus aurata</i> ) following daily acute stress, <i>Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences</i> , 1995, vol. 52, pp 2339-2346.
65	Takahashi H., Sakamoto T., Hyodo S., Shepherd B.S., Kaneko T. & Grau E.G., Expression of glucocorticoid receptor in the intestine of a euryhaline teleost, the Mozambique tilapia ( <i>Oreochromis mossambicus</i> ): Effect of seawater exposure and cortisol treatment, <i>Life Sciences</i> , 2006, vol.78, pp 2329-2335.

66	Terova G., Gornati R., Rimoldi S., Bernardini G. & Saroglia M. Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> , L.) reared at high stocking density, <i>Gene</i> , 2005, vol.357, pp 144-151.
67	Tort L., Balasch J.C. & MacKenzie S., Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence, <i>Contributions to Science</i> , 2004, vol. 2(4), pp 443-454.
68	Trenzado C.E., Carrick T.R. & Pottinger T.G., Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress, <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 2003, vol.133, pp 332-340.
69	Van Weerd J.H. & Komen J., The effects of stress on growth in fish: a critical appraisal, <i>Comparative Biochemistry and Physiology</i> , 1998, Part A vol.120, pp 107-112.
70	Vazzana M., Vizzini A., Di Bella M.L., Celi M. & Parrinello N., Expression of a glucocorticoid receptor (DIGR1) in several tissues of the teleost fish <i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>Tissue and Cell</i> , Article in press, 2007.
71	Vijayan M.M., Raptis S. & Sathiyaa R., Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout, <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 2003, vol.132, pp 256-263.
72	Vizzini A., Vazzana M., Cammarata M., Parrinello N., Peritoneal cavity phagocytes from teleost sea bass express a glucocorticoid receptor (cloned and sequenced) involved in genomic modulation of the <i>in vitro</i> chemiluminescence response to zymosan, <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 2007, vol.150, pp 114-123.
73	Wang N., Gardeur J.-N., Henrotte E., Marie M., Kestemont P. & Fontaine P., Determinism of the induction of the reproductive cycle in female Eurasian perch, <i>Perca fluviatilis</i> : Identification of environmental cues and permissive factors, <i>Aquaculture</i> , 2006, vol.261, pp 706-714.
74	Wedemeyer G.A., <i>Physiology of fish in intensive culture systems</i> , ed. international thomson editores, Mexico, 1996, 232 pages.
75	Wendelaar Bonga S.E., The stress response in fish, <i>Physiological Reviews</i> , 1997, vol.77, pp 591-625.
76	Weyts F.A.A., Flik G., Rombout J.H.W.M. & Verburg-van Kemenade B.M.L., Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, <i>Cyprinus carpio</i> L., <i>Developmental and Comparative Immunology</i> , 1998a, vol.22, No. 5/6, pp 551-562.
77	Weyts F.A.A., Verburg-van Kemenade B.M.L. & Flik G., Characterisation of Glucocorticoid Receptors in Peripheral Blood Leukocytes of Carp, <i>Cyprinus carpio</i> L., <i>General and Comparative Endocrinology</i> , 1998b, vol.111, pp 1-8.
78	Weyts F.A.A., Verburg-van Kemenade B.M.L., Flik G., Lambert J. G. D. & Wendelaar Bonga S.E., Conservation of Apoptosis as an Immune Regulatory Mechanism: Effects of Cortisol and Cortisone on Carp Lymphocytes, <i>Brain Behavior and Immunity</i> , 1997, vol.11, pp 95-105.
79	Weyts F.A.A., Cohen N., Flik G. & Verburg-van Kemenade B.M.L., Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish, <i>Fish &amp; Shellfish Immunology</i> , 1999, vol.9, pp 1-20.
80	Weyts F.A.A., Flik G. & Verburg-van Kemenade B.M.L., Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes, <i>Developmental and Comparative Immunology</i> , 1998c, vol.22, No.5/6, pp 563-572.

81	Wojtaszek J., Dziewulska-Szwajkowska D., Łozińska-Gabska M., Adamowicz A. & Dżugaj A., Hematological effects of high dose of cortisol an the carp ( <i>Cyprinus carpio</i> L.): cortisol effect on the carp blood, General and Comparative Endocrinology, 2002, vol.125, pp 176-183.
82	Yin Z., lam T.J. & Sin Y.M., The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp ( <i>Cyprinus carpio</i> L.), Fish & Shellfish Immunology, 1995, vol.5, pp 519-529.